

Helena Isabel da Silva Laronha

Licenciada em Química Aplicada - Ramo de Biotecnologia

Inibidores de Metaloproteínas de Matriz para Resinas Dentárias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica para Saúde

Orientador:

Dra. Krasimira Todorova Markova-Petrova
Investigadora Auxiliar
FCT-UNL

Co-orientador:

Prof. Dr. Francisco Jorge Fernandes Caldeira
Professor Associado
Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Dra. Teresa Catarino (FCT-UNL)

Arguente: Dra. Rita Ventura (ITQB-UNL)

Vogal: Dra. Krasimira Petrova (FCT-UNL)

Monte da Caparica, Outubro de 2015

Helena Isabel da Silva Laronha

Licenciatura em Química Aplicada- Ramo de Biotecnologia

Inibidores de Metaloproteínases de Matriz para Resinas Dentárias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica para a Saúde

Orientador:

Dra. Krasimira Todorova Markova-Petrova
Investigadora Auxiliar
FCT-UNL

Co-orientador:

Prof. Dr. Francisco Jorge Fernandes Caldeira
Professor Associado
Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Dra. Teresa Catarino (FCT-UNL)

Arguente: Dra. Rita Ventura (ITQB-UNL)

Vogal: Dra. Krasimira Petrova (FCT-UNL)

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Monte da Caparica, Outubro de 2015

Direitos de Cópia

Helena Isabel da Silva Laronha, *Copyright*

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comercial, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Dedicado a uma grande amiga e lutadora,
Dilar Parreira

Agradecimentos

Esta página é demasiado pequena para agradecer a todos aqueles que estiveram presentes neste último ano, pelo apoio que deram-me e pelas brincadeiras que passámos, a todos: muito obrigada!

Os primeiros agradecimentos vão para os meus orientadores, que aceitaram-me neste projeto, dando-me a oportunidade de trabalhar em duas áreas fascinantes: a química e a bioquímica. À Dr.^a Krasimira Petrova, por me acolher “de braços abertos” no seu grupo, desde início, por toda a ajuda e disponibilidade que demonstrou ao longo do ano. Ao Prof.^o Jorge Caldeira que ausente da FCT auxiliou-me e apoiou-me, esteve ao meu lado, fez-me focar no trabalho real sempre que entusiasmava-me demasiado e queria “dar um passo maior do que a perna” e deu-me a oportunidade de participar numa conferência, com um *poster*.

Também quero agradecer à Prof.^a Maria Teresa Barros, por deixar-me usufruir dos seus laboratórios, por ter-me responsabilizado por um, uma experiência de grande valor para mim e, mesmo não estando dentro do trabalho, demonstrou-se sempre disponível para ajudar-me.

É claro que não esqueço-me de vocês, meus *Super* colegas de laboratório! “Oh Cláudia! Agora sou eu que digo-te uma coisa!” Um grande obrigado, por ajudares-me sempre que precisei, por ouvires-me e pelas risadas e aventuras que passámos juntas. Ao André Jorge, o meu companheiro de laboratório, obrigada por todos os “filmes”, dignos de Óscar, e brincadeiras que passámos no laboratório 306, prometo que vou ter mais cuidado com o filtro, e ao João Lopes, pela preocupação que mostraste, por estares lá a ajudar-me sempre que as reacções não estavam a correr como queria, a motivar-me, dando-me força para continuar. A todos vocês amigos, desejo-vos um grande futuro, pois merecem e sem vocês os laboratórios não são a mesma coisa!

Também quero agradecer ao José Nuno, que teve uma grande paciência em aturar as minhas birras e *stresses*, que não são fáceis, pelo carinho e dedicação, pelas espadeiradas todas e por nunca desistires de mim, sendo o meu grande porto de abrigo neste mar, que às vezes mostrava-se tenebroso.

E por último, mas não menos importante, aliás é o motivo pelo qual estou a apresentar esta dissertação, um enorme obrigado à minha mãe! Sei que ganhaste muitos cabelos brancos comigo nestes 5 anos, passámos por muito juntas, mas nunca desististe de mim e fizeste de tudo para eu estar onde estou agora. A ti *mã*, MUITO OBRIGADA!

Resumo

Os dentes são constituídos por 3 tipos de tecidos: esmalte, dentina e polpa. A dentina, para além dos minerais de apatite ou fosfato de cálcio, possui na sua composição 30% de matéria orgânica, nomeadamente colagénio e seus derivados.

As restaurações dentárias envolvem a adesão entre o material restaurador e o dente, onde a capacidade de adesão baseia-se na ligação entre a resina ao esmalte e à dentina. A interface resina-esmalte tem-se demonstrado duradoura, no entanto a interface resina-dentina tem um tempo de vida menor, uma vez que a longo e a médio prazo, ocorre a microinfiltração, a desorganização das fibras de colagénio e a perda dos espaços interfibrilares, que caracterizam o insucesso das restaurações. O tempo de vida das restaurações efetuadas com resinas é de cerca de 5 anos, muito curto comparativamente às amálgamas tradicionais, que têm um período de vida de 10-20 anos.

As metaloproteínas de matriz (MMPs) pertencem à família de metzincinas, uma das muitas famílias que constituem a superfamília das endopeptidases. São enzimas zinco-dependentes e estão envolvidas em vários processos fisiológicos, tais como a degradação da matriz extracelular, colagénio ou fibronectina, na migração celular e remodelação dos tecidos e em processos patológicos, como doenças cardiovasculares ou na metástase de cancro. As MMPs são as únicas enzimas de mamíferos capazes de degradar o colagénio e têm sido encontradas na saliva e na dentina, sendo responsáveis pela degradação desta e curta longevidade das restaurações. Assim a incorporação de diferentes inibidores na interface resina-dentina poderá aumentar o tempo de vida desta.

A atividade das MMPs é inibida especificamente pelos inibidores tecidulares de metaloproteínas de matriz (TIMPs) e por compostos sintéticos, que quelatam o ião de zinco catalítico. Já foram estudados compostos como *Batimastat* e *Marimastat*, clorhexina e Galardina, nenhum altamente específico para cada tipo de MMP.

Este trabalho consistiu na síntese de potenciais inibidores e respetivos testes enzimáticos, onde se verificou a atividade inibitória nas MMPs-1, -2, -8, -9 e -13. Os compostos sintetizados são derivados de cloreto 4-vinilbenzilo, obtendo-se rendimentos globais entre os 13,82% e 85,22%. No total foram sintetizados e caracterizados pela primeira vez 13 compostos novos. Após as sínteses dos compostos, verificou-se a sua capacidade inibitória em diversas concentrações (1 mM; 0,1 mM; 0,05 mM e 0,01 mM). De um modo geral, todos os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre estas enzimas, obtendo-se especificidades variadas.

Palavras-chaves: metaloproteínas de matriz; collagenases; inibidores de MMP; resina dentária; restauração dentária

Abstract

Teeth are composed of three types of tissue: enamel, dentin and pulp. The dentin, in addition to the minerals apatite or calcium phosphate, contains 30% organic matter, including collagen and derivatives thereof.

Dental restorations involve an adhesion between the restorative material and the tooth. The adhesive capacity is based on the connection between the resin, enamel and dentin. The resin-enamel interface has demonstrated durability, however the resin-dentin interface has a shorter lifetime, since in long and medium term occurs microleakage, to disorganization of collagen fibers and loss of interfibrillar space, which characterize the failure of the restorations. The lifetime of the restorations made with resins is about 5 years, very short compared to traditional amalgams, which have a life span of 10-20 years.

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to the family of metzincins, one of several families that are the superfamily of endopeptidases. They are zinc-dependent enzymes, and are involved in various physiological processes, such as degradation of the extracellular matrix, collagen or fibronectin, cell migration, tissue remodeling and pathological processes, such as cardiovascular disease or cancer metastasis. MMPs are the only mammalian enzymes that are capable of degrading collagen and have been found in saliva and dentin, being responsible for its degradation and the short durability of the restorations. Thus, the incorporation of various inhibitors on the interface resin-dentin may increase the lifetime of this interface.

The activity of MMPs is specifically inhibited by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and synthetic compounds that chelate the catalytic zinc ion. Some compounds, such as Batimastat, Marimastat, clorohexidine and Galardine have been studied, but none of them was specific to MMPs.

This work consisted of the synthesis of potential inhibitors and respective enzyme tests, in order to evaluate their inhibitory activity on MMP-1, -2, -8, -9 and -13. The synthesized compounds were derived from 4-vinylbenzyl chloride, yielding overall yields between 13,82% and 85,22%. Altogether, 13 novel compounds were synthesized and characterized for the first time. After the synthesis of compounds, their inhibitory capacity has been evaluated at various concentrations (1 mM, 0.1 mM, 0.05 mM and 0.01 mM), performing enzymatic assays with MMP-1; -2; -8; -9 and -13. In general, all compounds showed inhibitory activity towards these enzymes, however it was not possible to draw conclusions about their specificity.

Key words: matrix metalloproteinases; collagenase; MMP inhibitors; dental resin; dental restoration

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de figuras	xv
Índice de Tabelas	xxv
Lista de Abreviaturas	xxvii
Lista de Compostos	xxix
Capítulo I Introdução	1
1.1 Constituição do dente	2
1.2 Restaurações Dentárias e Adesivos	3
1.3 Colagénio	7
1.4 Metaloproteínas de Matriz (MMPs)	8
1.5 Inibidores de MMPs	13
1.6 Monómeros	18
Capítulo II Discussão de resultados	21
2.1 Objetivo	22
2.2 Esquemas gerais das reações	23
2.2.1. Reações de 4-cianofenol (1) com cloreto de 4-vinilbenzilo (4)	23
2.2.2. Reações de brometo de benzilo (18) com cloreto de 4-vinilbenzilo (4)	24
2.3 Síntese	25
2.4 Ensaio Enzimáticos	47
2.5 Conclusão	65
Capítulo III Parte Experimental	69
3.1 Preâmbulo	70
3.2 Síntese dos compostos	71
3.2.1 Síntese do 2-(4-cianofenoxi)etanol (3) ⁽⁸⁷⁾	71
3.2.2 Síntese do composto 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo (5)	71
3.2.3 Síntese do 4-((5-bromopentil)oxi)benzonitrilo (7) ⁽⁸²⁾	72
3.2.4 Síntese do 4-((5-((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzeno (9) e do 4,4'- (((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi)) dibenzonitrile (10)	73
3.2.5 Síntese do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (11)	74
3.2.6 Síntese do 4-((5-(3-hidroxiбutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (13)	74
3.2.7 Síntese do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (15)	75
3.2.8 Síntese do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo (16)	76
3.2.9 Síntese do 3-(benziloxi)propan-1-ol (20)	76
3.2.10 Síntese do 1-((3-(benziloxi)propoxi)metil)4-vinilbenzeno (21)	77
3.2.11 Síntese do 4-(benziloxi)butan-2-ol (22)	77
3.2.12 Síntese do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi) (24)	78
3.2.13 Síntese do 3-(benziloxi)butan-2-ol (25)	79

3.2.14 Síntese do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno (26).....	79
3.3 Ensaio Enzimático.....	80
3.3.1 Preparação das soluções.....	80
3.3.2 Preenchimento da placa.....	81
Capítulo IV Bibliografia	85
Capítulo V Anexos.....	91

Índice de figuras

Capítulo I: Introdução

Figura 1.1: Tipo de dentes.	2
Figura 1.2: Estrutura do dente.	3
Figura 1.3: Dentina humana tratada com 32% de ácido fosfórico.	4
Figura 1.4: Etapas das restaurações dentárias.	4
Figura 1.5: Micrografia electrónica de transmissão da ligação resina-dentina.	5
Figura 1.6: Classificação dos adesivos contemporâneos.	6
Figura 1.7: Proteína de colagénio e aminoácidos constituintes.	7
Figura 1.8: Estrutura das fibras de colagénio.	8
Figura 1.9: Esquema genérico de uma enzima.	9
Figura 1.10: Estrutura geral das metaloproteinases de matriz (MMPs).	9
Figura 1.11: Estrutura da collagenase e da estromelisinase.	10
Figura 1.12: Estrutura da gelatinase.	10
Figura 1.13: Estrutura da matrilisina.	10
Figura 1.14: Estrutura da MMP transmembranar.	11
Figura 1.15: Estrutura da MMP ancorada em glicosilfosfatidilinositol (GPI).	11
Figura 1.16: Potenciais alvos de intervenção farmacológica para inibição das MMPs.	12
Figura 1.17: Possíveis locais de acção das MMPs na dentina.	12
Figura 1.18: Esquema da inibição enzimática.	13
Figura 1.19: Estrutura química do <i>Batimastat</i> (MM: 477,18 g/mol)	14
Figura 1.20: Estrutura química do <i>Marimastat</i> . (MM: 331,21 g/mol).	15
Figura 1.21: Estrutura química do <i>Tanomastat</i> . (MM: 410,91g/mol).	15
Figura 1.22: Estrutura química do <i>Prinomastat</i> . (MM: 423,50 g/mol)	15
Figura 1.23: Estrutura química de uma tetraciclina. (MM=444,44 g/mol)	16
Figura 1.24: Estrutura química da clorohexidina (MM=505,55 g/mol)	16
Figura 1.25: Estrutura química da Galardina (MM=374,44 g/mol).	17
Figura 1.26: Estrutura química do cloreto de benzalcónio.	17
Figura 1.27: Ácido acrilato (A) e metacrilato (B)	18

Capítulo II: Discussão de Resultados

Figura 2.1: Esquemas reaccionais gerais.	22
Figura 2.2: Mecanismo geral da reacção.	25
Figura 2.3: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN do composto 7 (à esquerda) e do composto 9 (à direita).	28
Figura 2.4: Mecanismo reaccional para síntese dos compostos 9 e 10	30

Figura 2.5: Fragmento do espectro de ^1H RMN do composto 13 .	34
Figura 2.6: Fragmento do espectro de ^{13}C RMN do composto 13 (à esquerda), onde os sinais assinalados são relativos ao composto minoritário 14 . Mecanismo reaccional para a formação do composto 14 (à direita).	35
Figura 2.7: Fragmentos dos espectros RMN do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, composto 15 .	36
Figura 2.8: Esquema da placa de cromatografia em camada fina, eluída em 1:2 Hex:AcOEt.	38
Figura 2.9: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN dos compostos 7 (à esquerda) e 16 (à direita).	38
Figura 2.10: Mecanismo das reacções de síntese dos compostos 9 , caso seja utilizado o 2,3-butanodiol, ou do composto 13 , se for utilizado o 1,3-butanodiol (A) e do composto 16 (B).	39
Figura 2.11: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN do cloreto de 4-vinilbenzilo, 4 (à esquerda) e do 4-vinilfenil metanol, 17 (à direita).	41
Figura 2.12: Proposta de mecanismo reaccional para a conversão do cloreto de 4-vinilbenzilo, 4 em 4-vinilbenzil metanol, 17 .	42
Figura 2.13: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN (A), HMQC (B) e COSY (C) do composto 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	44
Figura 2.14: Estrutura química dos compostos 22 e 23 e respectivos desvios químicos no espectro de ^{13}C RMN, em ppm.	44
Figura 2.15: Componentes de cada tipo de poço presente nas placas.	48
Figura 2.16: Reação de hidrólise enzimática.	49
Figura 2.17: Reacção entre o reagente de <i>Ellman's</i> com o produto sulfídrico da hidrólise enzimática.	49
Figura 2.18: Gráfico de estabilidade do substrato ao longo do tempo.	50
Figura 2.19: Gráfico de interação entre o substrato e os compostos 5 , 11 , 15 e 21 .	51
Figura 2.20: Gráfico de interação entre o substrato e os compostos 16 , 24 , 27 , 28 e 29 .	51
Figura 2.21: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-1 nas placas a , b , c e d .	52
Figura 2.22: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-2 nas placas a , b , c e d .	53
Figura 2.23: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-8 nas placas a , b , c e d .	54
Figura 2.24: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-9 nas placas b , c e d .	54
Figura 2.25: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-13 nas placas a , b , c e d .	55
Figura 2.26: Gráfico de densidade ótica em função do tempo.	56
Figura 2.27: Gráficos de densidade ótica em função do tempo do composto 29 nas diversas concentrações.	57
Figura 2.28: Gráfico de densidade ótica em função do tempo, para determinação das velocidades iniciais da atividade enzimática na ausência e na presença de inibidor.	60
Figura 2.29: Gráfico da actividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 5 .	60
Figura 2.30: Gráfico da actividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 11 .	61

Figura 2.31: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 15	61
Figura 2.32: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 16	62
Figura 2.33: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 21	63
Figura 2.34: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 24	63
Figura 2.35: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 27	64
Figura 2.36: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 28	64
Figura 2.37: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto 29	65

Capítulo III: Parte Experimental

Figura 3.1: Esquema do procedimento para a preparação das soluções mãe (88,8 mM), solução a 1 mM e 0,1 mM de inibidor.	81
Figura 3.2: Esquema geral da placa de 96 poços utilizada nos ensaios.	82
Figura 3.3: Esquema de um poço da microplaca..	83

Capítulo V: Anexos

Figura 5.1: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	92
Figura 5.2: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	92
Figura 5.3: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	93
Figura 5.4: Espectro de COSY (CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	93
Figura 5.5: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	94
Figura 5.6: Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-(4-cianofenol)etanol, 3	94
Figura 5.7: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	95
Figura 5.8: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	95
Figura 5.9: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	96
Figura 5.10: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	96
Figura 5.11: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	97
Figura 5.12: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, 5	97
Figura 5.13: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	98
Figura 5.14: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	98
Figura 5.15: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	99

Figura 5.16: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	99
Figura 5.17: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	100
Figura 5.18: Espectro de Infravermelho (KBr) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7	100
Figura 5.19: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	101
Figura 5.20: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	101
Figura 5.21: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	102
Figura 5.22: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	102
Figura 5.23: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	103
Figura 5.24: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9	103
Figura 5.25: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	104
Figura 5.26: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	104
Figura 5.27: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	105
Figura 5.28: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	105
Figura 5.29: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	106
Figura 5.30: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, 10	106
Figura 5.31: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	107
Figura 5.32: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	107
Figura 5.33: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	108
Figura 5.34: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	108
Figura 5.35: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	109
Figura 5.36: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 11	109
Figura 5.37: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 4-((5-((3-hidroxiбutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13	110

Figura 5.38: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13 .	110
Figura 5.39: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13 .	111
Figura 5.40: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13 .	111
Figura 5.41: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13 .	112
Figura 5.42: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 13 .	112
Figura 5.43: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	113
Figura 5.44: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	113
Figura 5.45: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	114
Figura 5.46: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	114
Figura 5.47: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	115
Figura 5.48: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 15 .	115
Figura 5.49: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	116
Figura 5.50: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	116
Figura 5.51: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	117
Figura 5.52: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	117
Figura 5.53: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	118
Figura 5.54: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16 .	118
Figura 5.55: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	119
Figura 5.56: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	119
Figura 5.57: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	120
Figura 5.58: Espectro de COSY (CDCl_3) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	120
Figura 5.59: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	121
Figura 5.60: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 .	121
Figura 5.61: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzelo)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	122
Figura 5.62: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzelo)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	122
Figura 5.63: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzelo)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	123

Figura 5.64: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 1-((3-(benzeloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	123
Figura 5.65: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 1-((3-(benzeloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	124
Figura 5.66: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-((3-(benzeloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21 .	124
Figura 5.67: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	125
Figura 5.68: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	125
Figura 5.69: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	126
Figura 5.70: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	126
Figura 5.71: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	127
Figura 5.72: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 .	127
Figura 5.73: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	128
Figura 5.74: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	128
Figura 5.75: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	129
Figura 5.76: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	129
Figura 5.77: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	130
Figura 5.78: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 24 .	130
Figura 5.79: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	131
Figura 5.80: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	131
Figura 5.81: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	132
Figura 5.82: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	132
Figura 5.83: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	133
Figura 5.84: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-(benziloxi)butan-2-ol, 25 .	133
Figura 5.85: Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) do 1-(((3-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 26 .	134
Figura 5.86: Espectro de ¹³ C RMN (101 MHz, CDCl ₃) do 1-(((3-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 26 .	134
Figura 5.87: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl ₃) do 1-(((3-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 26 .	135
Figura 5.88: Espectro de COSY (CDCl ₃) do 1-(((3-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 26 .	135
Figura 5.89: Espectro de HMQC (CDCl ₃) do 1-(((3-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, 26 .	136

Figura 5.90: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, 26 .	136
Figura 5.91: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.	137
Figura 5.92: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16 , 24 , 27 , 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.	137
Figura 5.93: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 , 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.	138
Figura 5.94: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24 , 27 , 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.	138
Figura 5.95: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 21 e 15 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.	139
Figura 5.96: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16 , 24 , 27 , 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.	139
Figura 5.97: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 , 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.	140
Figura 5.98: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24 , 27 , 28 , e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.	140
Figura 5.99: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.	141
Figura 5.100: Gráficos de OD _{415 nm} vs Tempo (min) para os compostos 16 , 24 , 27 , 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.	141
Figura 5.101: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 , 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.	142
Figura 5.102: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24 , 27 , 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.	142
Figura 5.103: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5 , 11 , 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.	143

Figura 5.104: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.....	143
Figura 5.105: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.....	144
Figura 5.106: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.....	144
Figura 5.107: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.....	145
Figura 5.108: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.....	145
Figura 5.109: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.....	146
Figura 5.110: Gráficos de OD _{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.....	146
Figura 5.111: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).....	147
Figura 5.112: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).....	147
Figura 5.113: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).....	148
Figura 5.114: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).....	148
Figura 5.115: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).....	149
Figura 5.116: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).....	149

Figura 5.117: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	150
Figura 5.118: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	150
Figura 5.119: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	151
Figura 5.120: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	151
Figura 5.121: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	152
Figura 5.122: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	152
Figura 5.123: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	153
Figura 5.124: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	153
Figura 5.125: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	154
Figura 5.126: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	154
Figura 5.127: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	155
Figura 5.128: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).	155
Figura 5.129: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).	156

Figura 5.130: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).156

Índice de Tabelas

Capítulo II: Discussão de Resultados

Tabela 2.1: Caracterização dos compostos 2-(4-cianofenoxy)etanol, 3 , e 4-(2-((4-vinilbenzil)oxy)etoxi)benzonitrilo, 5	26
Tabela 2.2: Caracterização do composto 4-((5-((3-hidroxiбутан-2-il)oxy)pentil)oxy)benzonitrilo (9), 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxy))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxy))dibenzonitrilo (10) e 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxy)butan-2-il)oxy)pentil)oxy)benzonitrilo (11).	32
Tabela 2.3: Caracterização dos compostos 4-((5-((3-hidroxiбutoxi)pentil)oxy)benzonitrilo, 13 e 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxy)butoxi)pentil)oxy)benzonitrilo, 15	37
Tabela 2.4: Caracterização dos compostos 4-[(5-bromopentil)oxy]benzonitrilo, 7 e 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, 16	40
Tabela 2.5: Caracterização dos compostos 3-(benziloxi)propan-1-ol, 20 e 1-((3-(benziloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, 21	43
Tabela 2.6: Caracterização dos compostos 4-(benziloxi)butan-2-ol, 22 e -(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxy)metil)-4-vinilbenzeno 24	45
Tabela 2.7: Caracterização dos compostos 3-(benziloxi)butan-2-ol, 24 e 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxy)metil)-4-vinilbenzeno, 26	46
Tabela 2.8: Parâmetros das equações das retas obtidas para os testes de estabilidade do substrato.	50
Tabela 2.9: Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e respetiva placa.	56
Tabela 2.10: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-1 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.	57
Tabela 2.11: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-2 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.	58
Tabela 2.12: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-8 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.	58
Tabela 2.13: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-9 na presença dos vários compostos inibidores, nas várias concentrações estudadas.....	59
Tabela 2.14: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-13 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.	59

Capítulo III: Parte Experimental

Tabela 3.1: Volumes pipetados de cada MMP a ser estudada e de buffer para preparar as soluções que irão ser colocadas na placa.....	81
Tabela 3.2: Distribuição dos poços, respetivas funções e componentes adicionados.	82

Capítulo V: Anexos

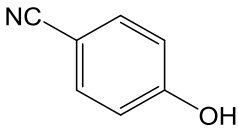
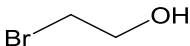
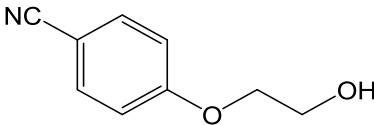
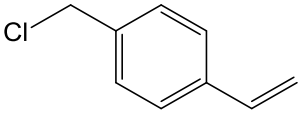
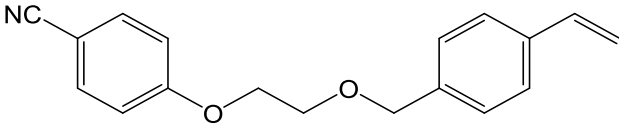
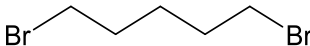
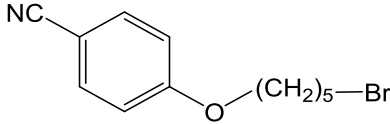
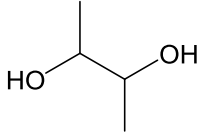
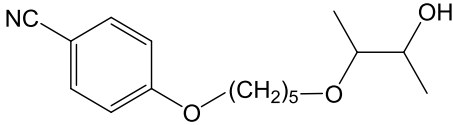
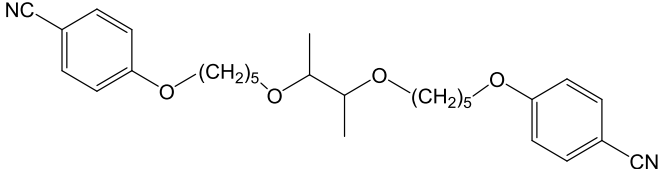
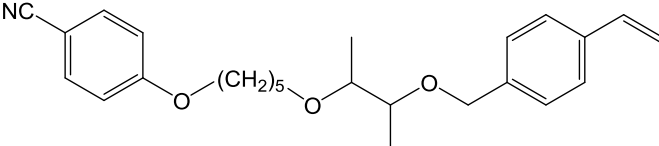
Tabela 5.1: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 5	157
Tabela 5.2: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 11	157
Tabela 5.3: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 15	157
Tabela 5.4: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 16	157
Tabela 5.5: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 21	157
Tabela 5.6: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 24	158
Tabela 5.7: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 27	158
Tabela 5.8: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 28	158
Tabela 5.9: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 29	158

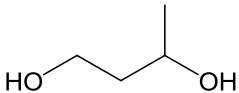
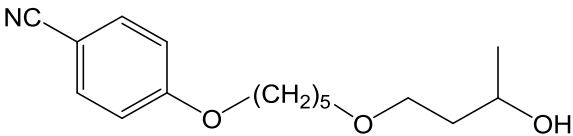
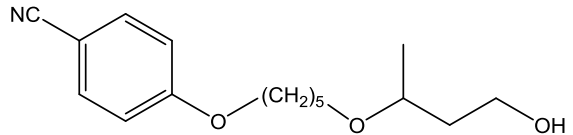
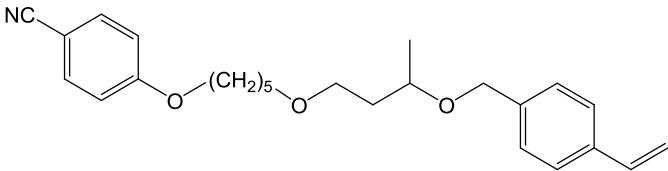
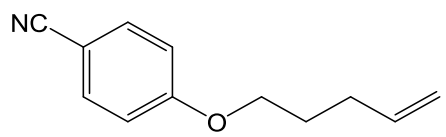
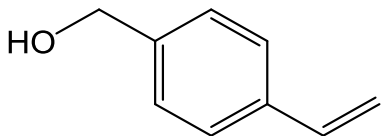
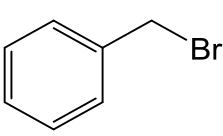
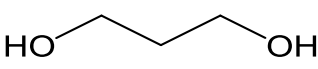
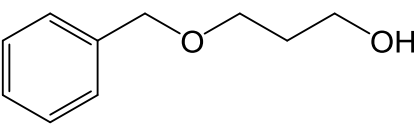
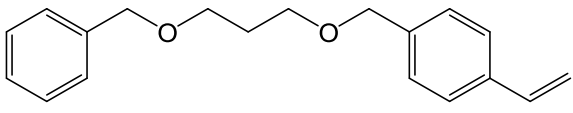
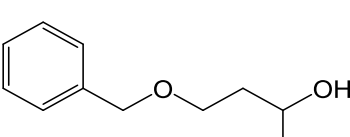
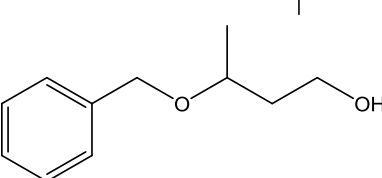
Lista de Abreviaturas

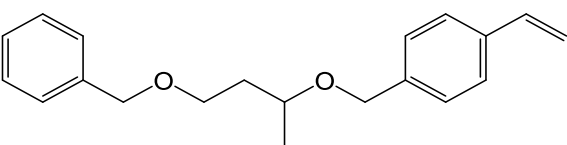
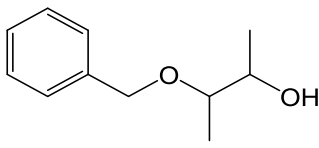
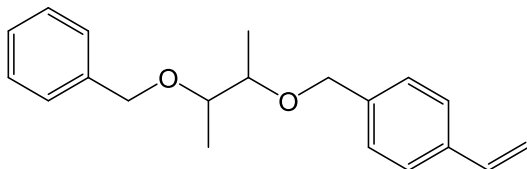
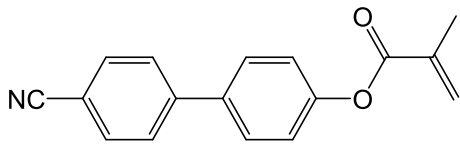
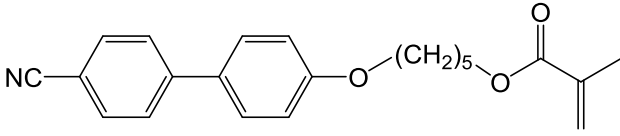
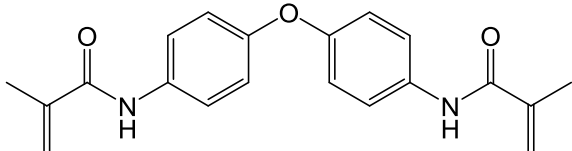
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
δ	Desvio químico
ν	Número de onda (cm^{-1})
AcOEt	Acetato de etilo
Ar	Aromático
BAC	Cloreto de benzalcônio
CHX	C loro h exidina
COSY	C orrelation S pectroscopy- Espectrometria de correlação
DEPT	D istortionless E nhancement P olarization T ransfer- Incremento sem distorção por transferência de polarização.
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DTNB	5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupletos
E	Enzima
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
I	Inibidor
IC_{50}	Concentração que causa inibição em 50% das enzimas
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Hex	Hexano
HMQC	H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence- Correlação heteronuclear de múltiplo quantum
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
NIDCR	N ational I nstitute of D ental and C raniofacial R esearch
MMP	Metaloproteinases de matriz
MT-MMP	Metloproteinases de matriz tipo membrana
m	Multipeto
min	Minuto
NNGH	N -isobutil- N -(4-metoxifenilsulfonil)glicil-hidroxâmico
OD	<i>Optical density</i> - densidade ótica
P	Produto
ppm	Partes por milhão
QAC	Derivados de amônio quaternário
R^2	Coeficiente de correlação linear

R _f	Factor de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Substrato
s	Singuleto
TIMP	Inibidores tecidulares de metaloproteinases de matriz
TMS	Tetrametilsilano
t	Tripleto
TNB	Ácido 2-nitro-5tiobenzóico
V ₀	Velocidade inicial

Lista de Compostos

- | | | |
|----|--|---|
| 1 |  | 4-cianofenol |
| 2 |  | 2-bromoetanol |
| 3 |  | 2-(4-cianofenol)etanol |
| 4 |  | cloreto de 4-vinilbenzilo |
| 5 |  | 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo |
| 6 | 
(= Br-(CH ₂) ₅ - Br) | 1,5-bromopentano |
| 7 |  | 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo |
| 8 |  | 2,3-butanodiol |
| 9 |  | 4-(((5-bromopentil)oxi)butan-2-il)oxi)benzonitrilo |
| 10 |  | 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo |
| 11 |  | 4-(((5-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo |

12		1,3-butanodiol
13		4-((5-((3-hidroxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo
14		4-((5-((4-hidroxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo
15		4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo
16		4-(pente-4-en-1-ilo)benzonitrilo
17		4-vinilfenil metanol
18		brometo de benzilo
19		1,3-propanodiol
20		3-(benzilo)propan-1-ol
21		1-((3-(benzilo)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno
22		4-(benzilo)butan-2-ol
23		3-(benzilo)butan-1-ol

- 24  1-(((4-(benziloxy)butan-2-yl)oxy)methyl)-4-vinilbenzeno
- 25  3-(benziloxy)butan-2-ol
- 26  1-(((3-benziloxy)butan-2-yl)oxy)methyl)-4-vinilbenzeno
- 27  4'-isocianobifenil-4-il metacrilato
- 28  5-(4-cianofenoxi)pentil metacrilato
- 29  N,N'-(4,4'-oxibis(4,1-fenileno))bis(2-metilacrilamida)

Capítulo I Introdução

1.1 Constituição do dente

Os dentes permitem a correta mastigação dos alimentos, facilitando assim a digestão destes, no entanto também estão muito associados a aspetos estéticos e de auto estima.

Os dentes estão afixados ao maxilar e à gengiva através da sua **raiz**, sendo que a única parte exposta é a **coroa**. A superfície da coroa determina a função do dente, por exemplo, nos incisivos, a superfície é plana e laminar, tendo a função de corte, enquanto os caninos têm superfícies aguçadas, sendo os mais adequados para o rasgar dos alimentos. Por fim os molares possuem superfícies planas e largas, conferindo-lhes a função de mastigar (figura 1.1).

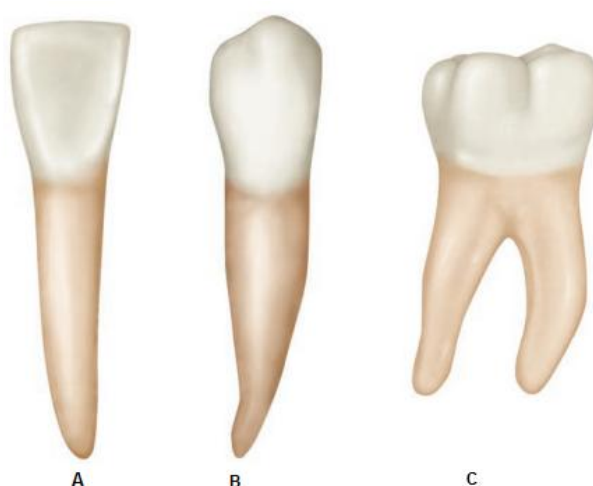


Figura 1.1: Tipo de dentes. A: Incisivo; B: Canino; C: Molar (imagem retirada de *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology and Occlusion*)¹

Para além destes dois componentes, os dentes são constituídos por 3 tipos de tecidos: esmalte, dentina e polpa (figura 1.2). O **esmalte** localiza-se na superfície da coroa e é o tecido mais rígido do corpo humano, tendo a capacidade de suportar o *stress* do processo da mastigação. A sua composição consiste em 96% de matéria inorgânica, nomeadamente cristais de hidroxiapatite e 4% de matéria orgânica.² O esmalte não tem fibras nervosas e protege a dentina subjacente, no entanto, só é formado uma única vez, não sendo regenerado. Assim, quando este tecido é danificado pela cárie é necessário reconstruir o dente.

A **dentina** é um tecido mais suave do que o esmalte, ligeiramente compressível e elástico, sendo encontrado no interior da coroa. A dentina é composta por cerca de 50% de volume mineral, dos quais 70% é apatite ou fosfato de cálcio; 30% de matéria orgânica, donde 20% corresponde a colagénio e derivados de colagénio; e 20% de líquido.³ A superfície interna da dentina forma uma cavidade com paredes rígidas, onde pode ser encontrada a polpa.

Por fim, a **polpa** é um tecido mole, compreendido na cavidade pulpar e é onde estão incorporados numerosos vasos sanguíneos e nervos. Uma das funções da polpa é a formação da dentina.

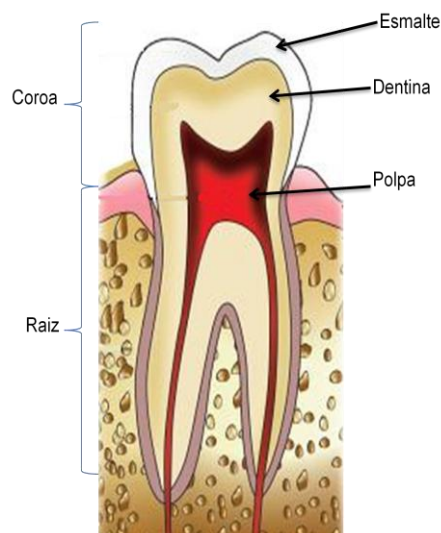


Figura 1.2: Estrutura do dente. (imagem retirada de *Textbook of Dental Anatomy and Oral Physiology*)⁴

1.2 Restaurações Dentárias e Adesivos

Ao longo dos últimos 45 anos, as restaurações dentárias têm evoluído com o desenvolvimento das resinas compostas.

Os sistemas adesivos utilizados nas restaurações dentárias são responsáveis pela adesão do material restaurador e o dente. Os adesivos são baseados em ligações químicas, onde uma extremidade da molécula estabelece uma ligação com os íons de cálcio ou com proteínas da dentina (colagénio) e a outra extremidade co-polimeriza³, através de um processo de polimerização de radicais livres da ligação dupla ($C=C$).⁵ Os adesivos são compostos por monómeros de diferentes pesos moleculares, normalmente dimetacrilatos e metacrilatos, solventes orgânicos e um preenchimento inorgânico, que melhora a resistência mecânica da restauração.⁶

A capacidade de adesão é baseada na ligação entre a resina ao esmalte e á dentina. A ligação resina-esmalte tem-se mostrado ser duradoura, no entanto a ligação resina-dentina (figura 1.3) é a mais complicada e com um tempo de vida menor.⁷ A dentina tem características hidrófilas, sendo necessário desenvolver adesivos com formulações hidrófilas, que possibilita a retenção dos compósitos de resina à dentina e garantindo o sucesso do adesivo. Até à data, as ligações dentina-resina são imperfeitas, sendo uma das razões o movimento de fluídos dentro do complexo tubular durante a infiltração⁸, devido às pressões sofridas durante a mastigação. Assim, as fibras de colagénio expostas não são protegidas por agentes desnaturantes e ficam suscetíveis à degradação por parte das MMPs.⁹ As propriedades mecânicas destas fibras de colagénio são inferiores às fibras protegidas pela resina, sendo uma barreira para o progresso das restaurações.

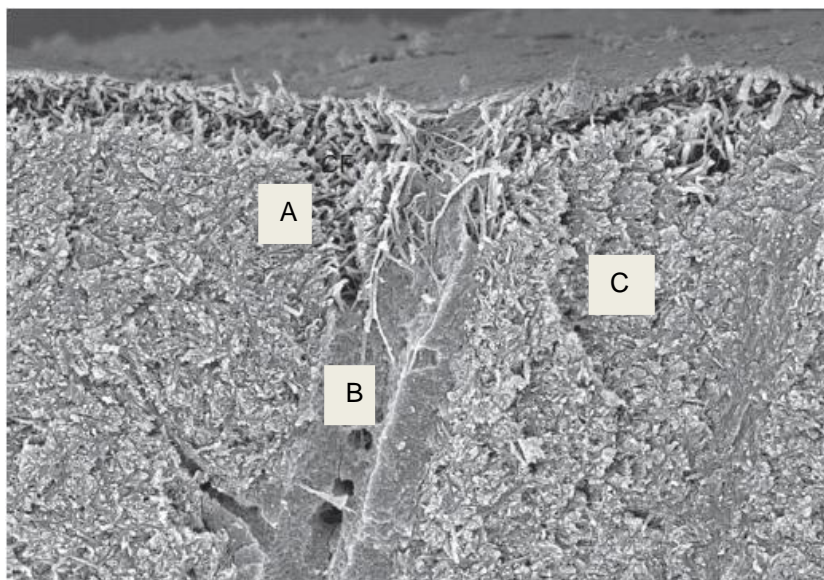


Figura 1.3: Dentina humana tratada com 32% de ácido fosfórico. A: Fibras de colagénio expostas pelo ácido; B: Túbulo; C: Dentina (imagem retirada de *Looking for the ideal adhesive – A review*)¹⁰

Nas restaurações dentárias (figura 1.4), o dente é inicialmente desmineralizado na superfície do esmalte, através de um tratamento com ácido fosfórico, expondo as fibras de colagénio e aumentando as porosidades da superfície exposta, criando microporosidades. De seguida, a resina é aplicada sobre a superfície e ocorre a infiltração desta por entre os espaços das fibras de colagénio.

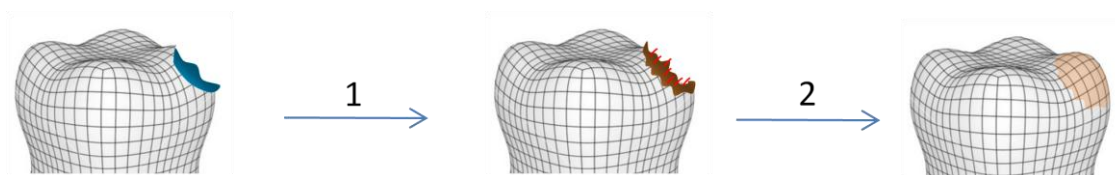


Figura 1.4: Etapas das restaurações dentárias. **1:** tratamento com ácido fosfórico da superfície do dente, expondo as fibras de colagénio. **2:** os monómeros da resina, presentes no primer são aplicados na superfície do dente e a resina é adicionada no final do processo, havendo a sua foto-polimerização.

O mecanismo de ligação é um processo que envolve a substituição de minerais removidos do tecido por monómeros de resina, que tornam-se micromecanicamente interligados.^{11,12} A resina polimeriza e fica ligada aos cristais de hidroxiapatite do esmalte e difunde pelas fibras de colagénio constituintes da dentina.¹² A este processo denomina-se de **hibridização** e a camada formada dá-se o nome de **camada híbrida**.^{11,13} A natureza iónica e hidrofílica dos adesivos influenciam a permeabilidade da camada híbrida, que é suscetível à degradação hidrolítica¹⁴ e à atividade das MMPs (figura 1.5).^{15,16}

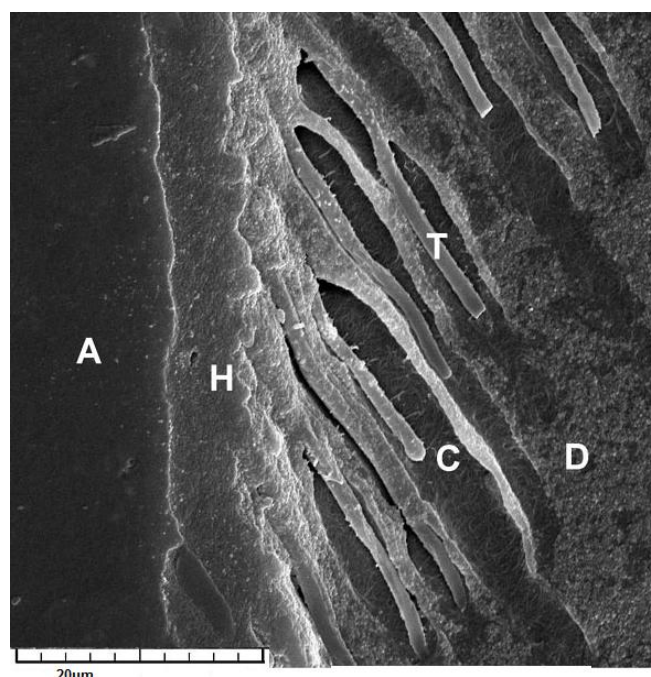


Figura 1.5: Micrografia eletrônica de transmissão da ligação resina-dentina. **A:** adesivo; **C:** túbulos; **D:** dentina; **H:** camada híbrida; **T:** tag. (imagem retirada de *SEM study on dentin/resin interface in primary teeth*)¹⁷

Assim o tratamento dentário envolve dois componentes, os **primers**, que são compostos por monómeros resinosos diluídos em solventes orgânicos e são hidrofílicos, preparando a superfície do dente para a posterior aplicação do adesivo com a resina. O **adesivo** é composto por monómeros mais viscosos, capazes de penetrar pelos espaços das fibras de colagénio expostas e têm um carácter hidrofóbico.

Atualmente existem dois tipos de adesivos¹⁸: adesivos **etch-and-rinse** e **self-etch** (figura 1.6). Os adesivos **etch-and-rinse** são sistemas que possuem um passo de condicionamento ácido do dente separado dos outros passos clínicos.^{11,12} Estes adesivos consistem na remoção da *smear layer* e desmineralização da superfície do dente através da utilização do condicionamento ácido. Para que ocorra uma eficiente hibridização é fundamental que as fibras de colagénio, após a desmineralização, estejam na presença de água, preservando os espaços interfibrilares para a posterior infiltração da resina. No entanto, para a infiltração desta é necessário retirar a água através de um processo de desidratação, onde os solventes (acetona ou etanol) se misturam com a água e são evaporados. A eliminação da água e dos solventes residuais é fundamental para garantir uma polimerização eficaz. Esta abordagem é mais eficaz para garantir uma ligação estável e eficiente.¹² Os adesivos **self-etch** não requerem um passo de condicionamento separado, sendo que na sua constituição estão presentes monómeros ácidos que possuem a função de condicionador e primer, simultaneamente¹², reduzindo assim o risco de ocorrência de erros durante a restauração¹¹, mas também a sensibilidade da técnica.¹² Existem dois tipos de adesivos: os fortes, com um pH muito baixo (<1), onde o mecanismo de adesão é baseado na difusão e os suaves, com um pH próximo de 2, que dissolvem parcialmente a superfície da dentina e a ligação é baseada nas

interações químicas entre os grupos carboxilos ou fosfatos do monómeros com a hidroxiapatite.^{11,19}

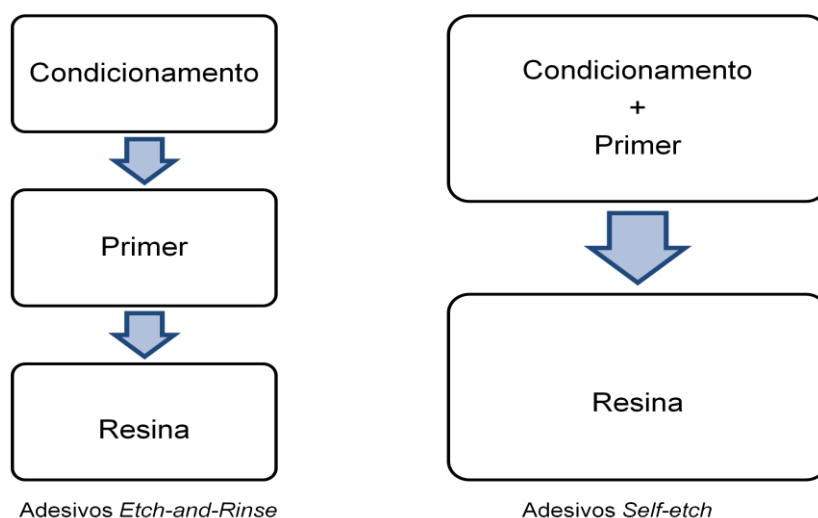


Figura 1.6: Classificação dos adesivos contemporâneos.

Segundo o plano do *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR) é aconselhável que as resinas sejam substituídas num espaço de cinco anos, sendo um custo de 5 bilhões de dólares por ano só nos EUA.²⁰ Em comparação com as amálgamas tradicionais, que têm um período de vida de 10-20 anos, o tempo de vida dos adesivos é bastante curto.⁶ Existem cinco estratégias para o aumento da longevidade das resinas²¹:

1. Aumentar o grau de conversão dos monómeros presentes na resina e a resistência a esterases;
2. Usar inibidores de enzimas collagenases;
3. Utilizar agentes de ligação cruzada, que aumenta as propriedades mecânicas e reduz a suscetibilidade do colagénio à degradação enzimática e aumenta a estabilidade da interface resina-dentina;
4. Substituir a água por etanol, para tornar a camada híbrida mais hidrofóbica;
5. Remineralizar a matriz de colagénio com biomiméticos, uma vez que os adesivos atuais são incapazes de substituir totalmente a água presente nas fibras de colagénio, sendo necessário a introdução destes compostos para manter a interface o mais seco que possível.

A médio e longo prazo, muitas das restaurações perdem a capacidade de selar e proteger os tecidos, levando à microinfiltração e à ocorrência de cárie, o que caracteriza o insucesso das restaurações. Uma limitação do sistema resina-dentina é a desorganização das fibras de colagénio e a perda da resina dos espaços interfibrilares.^{22,23} Estudos demonstram que as metaloproteínases de matriz (MMPs), que estão ligadas aos cristais de hidroxiapatite, podem ser ativadas pelos ácidos presentes nos adesivos²⁴, sendo responsáveis pela degradação do colagénio em meio aquoso.²⁵ Uma estratégia para aumentar a longevidade das

restaurações dentárias passa pela inibição destas enzimas. A incorporação de diferentes inibidores de MMPs na camada híbrida poderá aumentar o tempo de vida da interface resina-dentina.¹⁵

1.3 Colagénio

O **colagénio** é uma proteína estrutural que compreende um terço do total proteico em humanos, sendo o componente mais predominante na matriz extracelular.²⁶ A proteína de colagénio é composta por uma **hélice tripla**, duas cadeias idênticas e uma cadeia adicional, que diferem na sua composição química. Comparando com as proteínas em geral, a composição do colagénio é atípica, por apresentar **elevado teor de hidroxiprolina** (figura 1.7).²⁷

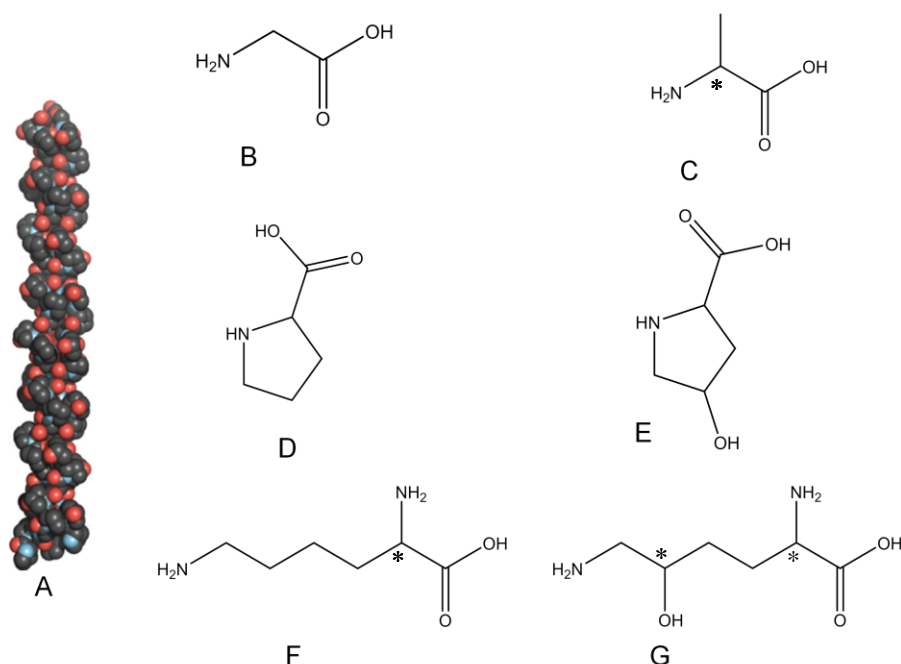


Figura 1.7: Proteína de colagénio e aminoácidos constituintes. A: tripla hélice de colagénio; B: glicina; C: alanina; D: prolina; E: hidroxiprolina; F: lisina; G: hidroxilisina. (imagem da proteína de colagénio retirada de *Collagen Structure and Stability*)²⁶

Em 1940, Astbury & Bell²⁸ propuseram que a molécula de colagénio era composta por uma única cadeia polipeptídica, no entanto, anos mais tarde, em 1951, na edição da *Proceeding of the National Academy of Sciences*, onde era esclarecida a estrutura das hélices α e β , Pauling e Corey²⁹ propuseram uma estrutura para o colagénio, com três cadeias polipeptídicas, em forma helicoidal e mantidas juntas através de pontes de hidrogénio. Em 1954, Ramachandran e Kartha³⁰ descreveram a estrutura em tripla hélice, com base nos dados de difração, estrutura que foi melhorada por Rich e Crick^{31,32} e por North até chegar à estrutura que é aceite hoje.

O colagénio individual, conhecido como **tropocolagénio**, é capaz de se auto-organizar em macromoléculas, as **fibras de colagénio**, componentes essenciais nos tecidos. Estas

fibras de colagénio podem ser encontradas nos tecidos fibrosos, como tendões, ligamentos e pele ou em cartilagens, ossos, vasos sanguíneos e na dentina dos dentes (figura 1.8). Quando o colagénio é hidrolisado de forma irreversível, chama-se **gelatina**.

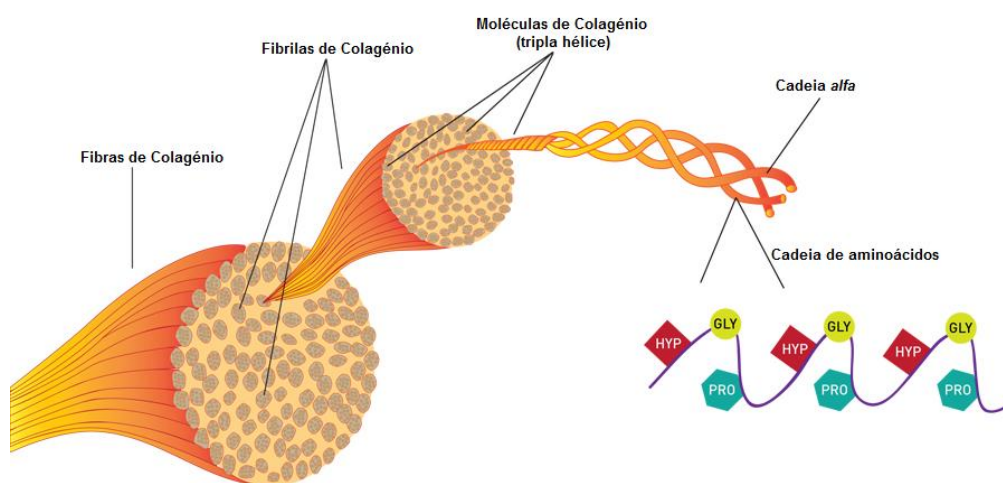


Figura 1.8: Estrutura das fibras de colagénio. (imagem retirada de <http://www.proto-col.com/blog/2014/07/collagen/>, consultado a 4 de Setembro de 2015)

No total, já foram identificados 28 tipos de colagénios, que diferem entre si nos locais onde estão presentes, dos quais cinco tipos são mais comuns. O **colagénio do tipo I** está presente na pele, tendões, órgãos e ossos e mais de 90% do colagénio do corpo corresponde a este tipo de colagénio. O **colagénio do tipo II** encontra-se nas cartilagens e não difere morfologicamente do colagénio tipo I. Nas fibras reticulares, pulmões e artéria aorta encontra-se o **colagénio do tipo III** e nos rins e lâmina basal está presente o **colagénio do tipo IV**, que tem a característica de não se associar em fibras. Por fim, o **colagénio do tipo V** encontra-se nas superfícies celulares, cabelo e placenta.

Devido à importância que o colagénio tem no corpo, este deve apresentar características essenciais, tais como estabilidade térmica, resistência mecânica e capacidade de se envolver em interações específicas com outras biomoléculas.

1.4 Metaloproteínases de matriz (MMPs)

As enzimas têm poder catalítico, com elevado grau de especificidade para os seus substratos. A atividade catalítica das enzimas depende da conformação da proteína. Algumas enzimas requerem um componente químico adicional para desempenharem as suas funções, chamados **co-factor** (Fe^{2+} ; Mg^{2+} ; Mn^{2+} ou Zn^{2+}) ou um complexo orgânico ou organometálico-**coenzima**. Uma enzima proporciona o ambiente químico no qual uma dada reacção pode ocorrer de forma rápida, denominada de **sítio activo** (figura 1.9).

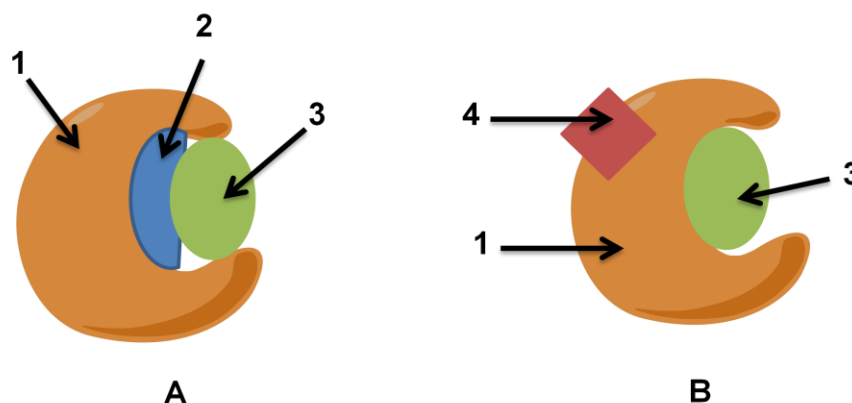


Figura 1.9: Esquema genérico de uma enzima. 1: Enzima; 2: Coenzima; 3: Substrato; 4: Cofactor

As **protéases** podem ser classificadas em protéases de serina, de cisteína, de aspartato e metaloproteínas, tendo por base o seu resíduo ou co-factor.³³

As **metaloproteínas de matriz** pertencem à família de **metzincinas**, que constituem a superfamília de **endopeptidases**, sendo dependentes dos iões de zinco e cálcio e encontram-se envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular³³⁻³⁵, colagénio, elastina, laminina e fibronectina³⁶, na migração celular, remodelação de tecido, formação do esmalte, processamento de antígenos²⁵ e na formação e calcificação da dentina.^{25,37} No entanto, as MMPs também estão envolvidas na inflamação e aumento dos efeitos adversos de doenças cardiovasculares³⁸ e na metástase de cancros. Até à data foram encontradas 26 tipo de MMPs.^{25,39}

Geralmente as MMPs são constituídas estruturalmente por um péptido sinal, um domínio pro-péptido (com cerca de 80 aminoácidos²⁵), um domínio catalítico e um domínio de hemopexina³³, tendo algumas um domínio transmembranar e citoplasmático (figura 1.10).³⁵

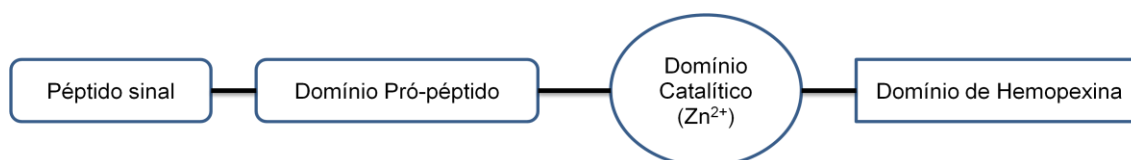


Figura 1.10: Estrutura geral das metaloproteínas de matriz (MMPs)

O **domínio catalítico** encontra-se ligado ao domínio de hemopexina através de uma região que apresenta três resíduos de histidina, coordenados com o ião de zinco⁴⁰ e uma metionina, que coloca a cadeia polipeptídica por baixo do ião de zinco, formando a cavidade hidrofóbica do centro catalítico.^{41,42} O **domínio de hemopexina** é importante para a degradação do substrato, uma vez que a sua ausência impossibilita a degradação do colagénio.⁴²

O gene humano da MMP consiste em 18 estruturas⁴³ e distingue-se das outras famílias de proteínases devido ao elevado grau de conservação das três histidinas e da metionina presentes do domínio catalítico.⁴⁴ Dependendo da homologia e do substrato específico, são

divididas em collagenases, estromelisinases, gelatinases, matrilisinases, MMPs de tipo membrana e outras.^{25,34}

As **collagenases**, MMP-1, -8, -13 e -18, têm a capacidade de clivar o colagénio do tipo I, II e III, entre outras moléculas não pertencentes à matriz extracelular (figura 1.11).^{36,45} O colagénio é degradado num local específico, a $\frac{3}{4}$ do N-terminal, dando origem à gelatina.⁴⁶

As **estromelisinases**, MMP-3, -10, -11, e -20, possuem alta eficiência proteolítica e têm capacidade de ativar pró-MMPs, para além de serem capazes de degradar colagénio do tipo IV, V, IX e X, gelatina e fibronectina (figura 1.11). A MMP-11 é a única MMP que é segregada sob a forma ativa, não sendo necessário ativá-la.³⁶

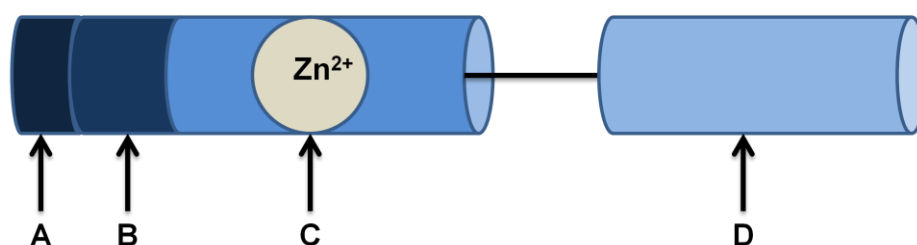


Figura 1.11: Estrutura da collagenase e da estromelisina. **A**: péptido sinal; **B**: pró-péptido; **C**: domínio catalítico; **D**: domínio de hemopexina.

As **gelatinases**, MMP-2 e -9, degradam o colagénio IV e a gelatina (figura 1.12).⁴⁷ Estruturalmente estas enzimas têm inserido no domínio catalítico um domínio de fibronectina.^{42,45}

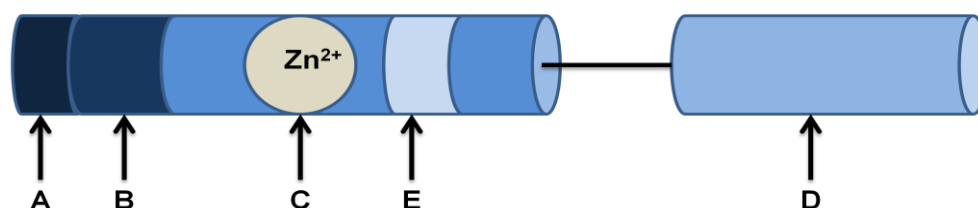


Figura 1.12: Estrutura da gelatinase. **A**: péptido sinal; **B**: pró-péptido; **C**: domínio catalítico; **D**: domínio de hemopexina; **E**: domínio de fibronectina.

As **matrilisinases**, MMP-7 e -26, são caracterizadas pela falta do domínio de hemopexina^{36,42}, sendo as metaloproteínas com menor peso molecular (figura 1.13).⁴⁸

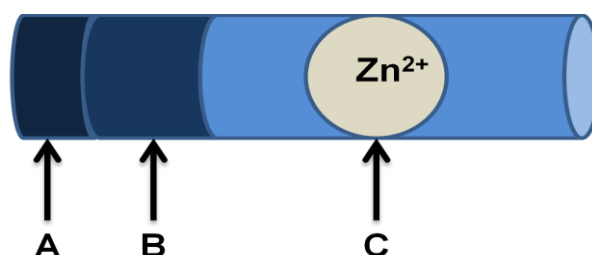


Figura 1.13: Estrutura da matrilisina. **A**: péptido sinal; **B**: pró-péptido; **C**: domínio catalítico.

As **metaloproteínases de matriz de tipo membrana**, MT-MMP, são classificadas como proteínas **transmembranares**, MMPs-14, -15-, -16 e -24 (figura 1.14), e proteínas **ancoradas no glicosilfosfatidilinositol** (GPI), MMPs-17 e -25 (figura 1.15). Todas estão envolvidas na ativação de outras MMPs.⁴⁹

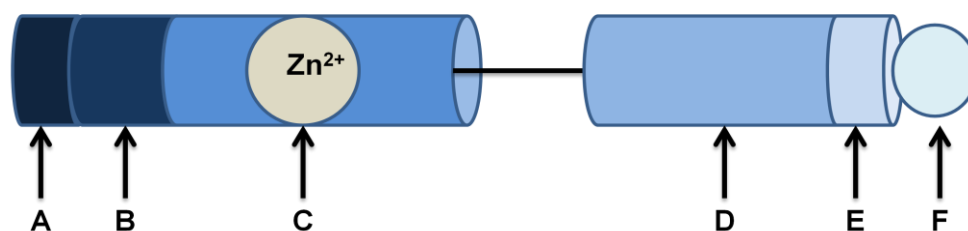


Figura 1.14: Estrutura da MMP-transmembranar. **A:** péptido sinal; **B:** pró-péptido; **C:** domínio catalítico; **D:** domínio de hemopexina; **E:** domínio transmembranar; **F:** domínio citoplasmático.

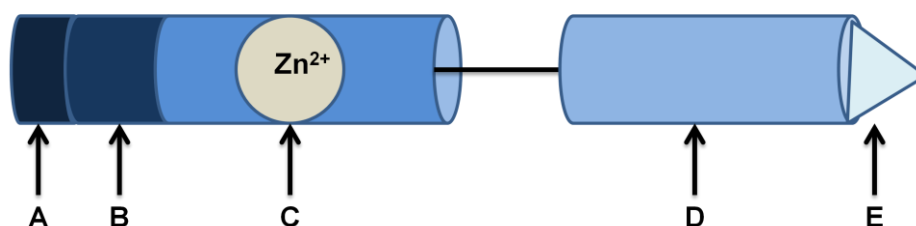


Figura 1.15: Estrutura da MMP-ancorada em glicosilfosfatidilinositol (GPI). **A:** péptido sinal; **B:** pró-péptido; **C:** domínio catalítico; **D:** domínio de hemopexina; **E:** domínio de ancoragem ao GPI.

Por fim existem outras MMPs, que não apresentam semelhanças com as MMPs dos grupos referidos anteriormente. Neste grupo estão incluídas as MMPs-12, -19, -21, -22, -23, -27 e -28.⁴⁹

As MMPs são altamente reguladas a nível da expressão do gene como na ativação proteica. Em geral, os genes não são expressos constitutivamente *in vivo*⁵⁰, sendo a transcrição induzida por uma grande variedade de estímulos extracelulares, como citocinas, fatores de crescimento e interações célula-célula.³⁵

A maioria das MMPs são secretadas sob a forma de precursores⁵¹, **pró-MMPs**, que são ativados proteoliticamente no espaço extracelular. As pró-MMPs são mantidas na forma inativa através da interação entre o resíduo de cisteína, localizado no domínio pró-peptídico, e o zinco catalítico, bloqueando o acesso do substrato ao centro activo.^{33,52} A clivagem proteolítica do pro-péptido pode ser obtida por autocatálise ou pela ação de outras enzimas proteolíticas⁵³, dissociando a ligação covalente entre o resíduo de cisteína e o zinco, expondo-o ao substrato.^{33,54}

A expressão e activação das MMPs envolvem vários processos, tais como, transcrição do gene, secreção da pró-MMP para o meio extracelular e activação desta, todas possíveis alvos para intervenção farmacológica (figura 1.16).³⁵

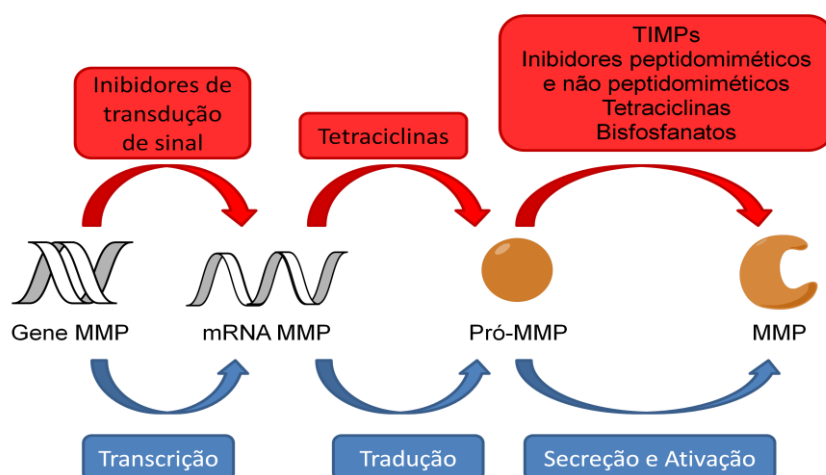


Figura 1.16: Potenciais alvos de intervenção farmacológica para inibição das MMPs.

As MMPs são as únicas enzimas de mamíferos capazes de degradar o colagénio³³ e têm sido encontradas na saliva e na dentina, nomeadamente as MMPs-2, -8, -9 e -13 (figura 1.17).^{55,56} As técnicas de restauração dentária requerem ácidos fortes, que activam as MMPs presentes na dentina, promovendo a sua actividade, degradando o colagénio.^{25,57}

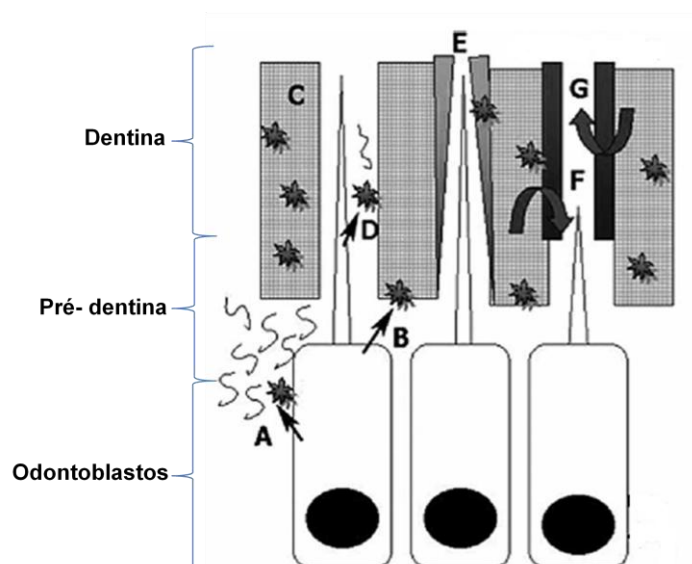


Figura 1.17: Possíveis locais de acção das MMPs na dentina. (marcados com estrela). **A:** organização da matriz da dentina em pré-dentina; **B:** regulação da mineralização com proteoglicano na pré-dentina; **C:** incorporação na dentina; **D:** degradação do colagénio; **E:** participação na formação e mineralização da dentina; **F:** libertação e activação de factores de crescimento ligados à dentina, em processos de caries; **G:** participação na patogénese ou degradação da camada híbrida em restaurações dentárias. (imagem retirada de *The role of matrix metalloproteinases in the oral environment*²⁵)

No contexto das restaurações dentárias, os inibidores das MMPs desempenham um papel importante e têm sido sugeridos com intuito de retardar o processo de degradação da ligação entre a resina e a dentina.³⁷

1.5 Inibidores de MMPs

Inibidores de enzimas são agentes moleculares que interferem com a catálise, retardando ou interrompendo as reações enzimáticas. As enzimas catalisam todos os processos celulares, por isso os inibidores são os agentes farmacêuticos mais conhecidos e estudados. Há duas classes de inibidores: **reversíveis** e **irreversíveis**. Os inibidores (I) **reversíveis competitivos** competem com o substrato (S) para o sítio ativo, ocupando-o e evitando a ligação do substrato a este. Estes inibidores assemelham-se com o substrato e combinam com a enzima, formando um complexo enzima-inibidor (EI). Os inibidores **reversíveis não competitivos** ligam-se a um local distinto do sítio activo, alterando a conformação do sítio ativo. Os **inibidores irreversíveis** são aqueles que se ligam de forma covalente a um grupo funcional, que é essencial para a atividade enzimática (figura 1.18).

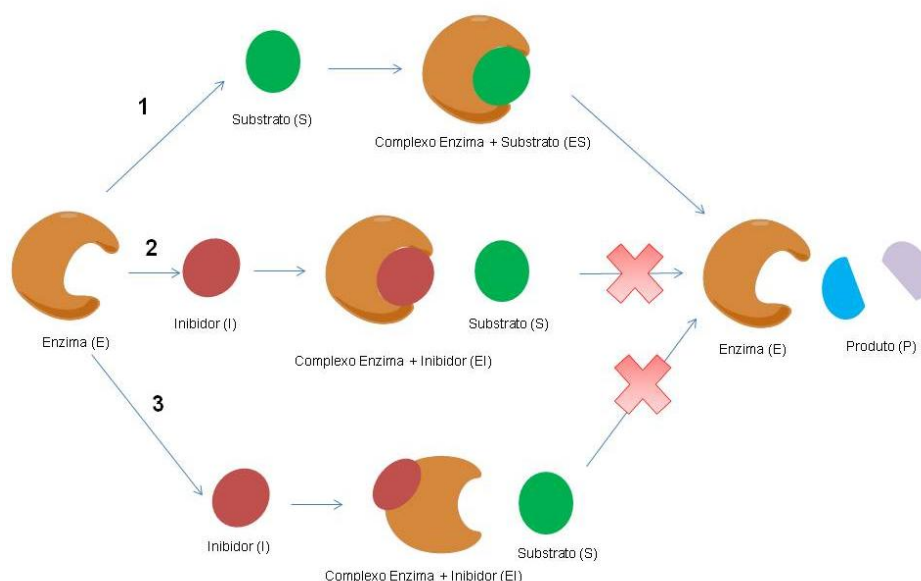


Figura 1.18: Esquema da inibição enzimática. Reação enzimática sem inibidor (1): a enzima (E) forma um complexo com o substrato (S) para dar origem ao produto (P), passando pela sua forma complexada (ES); Reacção enzimática com inibidor competitivo (2): a enzima forma um complexo com o inibidor (I), não havendo a formação do produto; Reação enzimática com inibidor não competitivo (3): o inibidor liga-se a um local distinto do centro ativo, alterando a configuração deste e impedido a ligação ao substrato.

A atividade das MMPs pode ser regulada por vários mecanismos, tais como, controlos positivos e negativos das transcrições dos genes, activação do estado latente, diferenças na especificidade do substrato e modulação por inibidores endógenos ou exógenos.⁵⁸

A atividade proteolítica das MMPs é inibida por proteases não específicas, como a α 2-macroglobulina ou a α 1-antiprotease e por **inibidores tecidulares específicos de metaloproteínases**, TIMPs (-1, -2, -3 e -4)³⁶, que exercem um duplo controlo³⁵:

- Inibe a forma ativa da MMP;
- Inibe a ativação das MMPs.

A expressão das TIMPs é regulada durante o desenvolvimento e remodelação tecidual³⁶. As TIMPs inibem a atividade catalítica através da formação de um complexo (não

covalente) com o sítio ativo (zinco).^{59,60} Estruturalmente são constituídas por um domínio N-terminal, que se liga ao local ativo das MMPs ativas através de interações não covalentes, bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo e um domínio C-terminal, que se liga ao domínio de hemopexina das pró-MMPs.³³

Os inibidores sintéticos de MMPs devem conter um grupo funcional, capaz de interagir com o íon de zinco catalítico da MMP. Este grupo proporciona uma interações através de pontes de hidrogénio com a estrutura da enzima e uma ou mais cadeias laterais que tenham interações Van der Waals.⁶¹ O inibidor tem que ser competitivo e ter como alvo as MMPs que estão presentes, por exemplo, em torno das fibrilas de colagénio.²² Têm sido estudados inibidores que incluem peptidomiméticos e não peptidomiméticos, derivados de tetraciclina e bisfosfanatos.^{35,62}

Os **inibidores peptidomiméticos** são derivados de pseudopeptídeos que mimetizam a estrutura do colagénio no local onde as MMPs vão-se ligar e clivar a estrutura. O inibidor liga-se reversivelmente ao sítio ativo da MMP, por ser um agente quelante do íon de zinco.⁶³ Vários grupos de ligação ao zinco foram testados incluindo os carboxilatos, aminocarboxilatos, sulfidrilo, derivados de ácidos fosfóricos e hidroxamatos, sendo estes últimos os mais desenvolvidos clinicamente. O *Batimastat* e o *Marimastat* são alguns exemplos de compostos peptidomiméticos.³⁵

O ***Batimastat*** (figura 1.19) é um hidroxamato de baixo peso molecular (figura 1.19), não biodisponível oralmente. Apesar de ser muito potente, não é seletivo, com um IC_{50} (concentração que causa inibição em 50% das enzimas) menor a 10 ng/ml para as MMPs-1, -2, -3, -7 e -9.³⁵

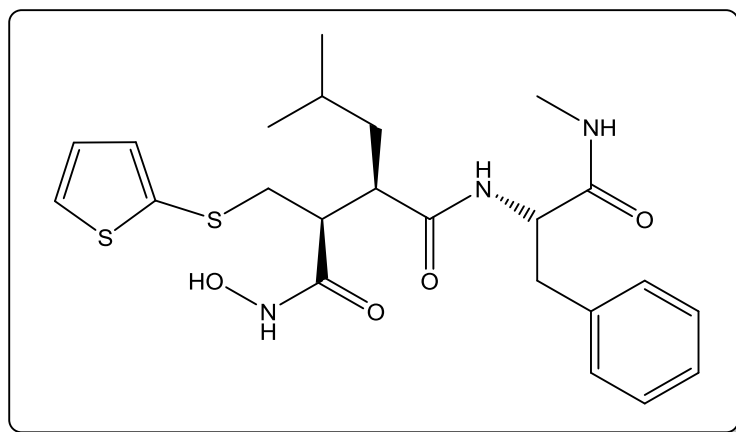


Figura 1.19: Estrutura química do *Batimastat* (MM: 477,18 g/mol)

O ***Marimastat*** (figura 1.20) é um inibidor de baixo peso molecular e biodisponível oralmente. Contém um hidroxamato que mimetiza a estrutura do colagénio. No entanto, também não é específico, inibindo a atividade das MMPs-1, -2, -3, -7 e -9 com IC_{50} de 2,5; 3; 115; 8 e 1,5 ng/ml, respetivamente.^{35,64}

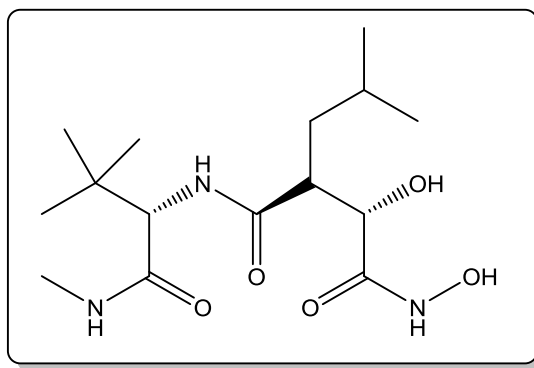


Figura 1.20: Estrutura química do *Marimastat*. (MM: 331,21 g/mol)

O problema dos inibidores peptídicos é a baixa biodisponibilidade oral e a pouca seletividade para as MMPs.⁶⁵ Assim têm sido sintetizados **inibidores não peptídicos**, baseados no local ativo das enzimas, possibilitando a síntese de compostos com atividade específica para os subtipos de MMPs envolvidos nas várias doenças.³⁵

O ***Tanomastat*** é um composto bifenílico (figura 1.21), biodisponível oralmente e potente contra as MMPs-2, -3 e -9, com um IC_{50} abaixo de $0,13 \mu\text{g/ml}$ ⁶⁶ e inibidor do crescimento tumoral e metástase.

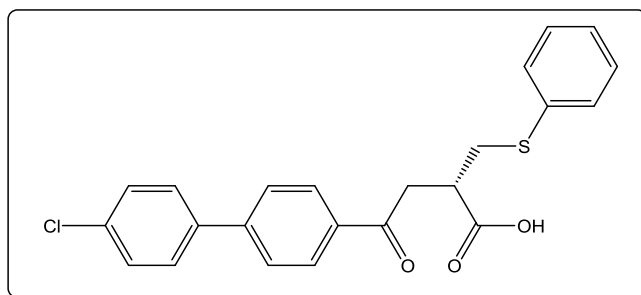


Figura 1.21: Estrutura química do *Tanomastat*. (MM: 410,91g/mol)

O ***Prinomastat*** (figura 1.22) é um inibidor mimetizador de colagénio, não peptídico e inibe as MMPs-2, -3, -9 e -13 com um IC_{50} abaixo de $0,13 \text{ ng/ml}$.⁶⁷

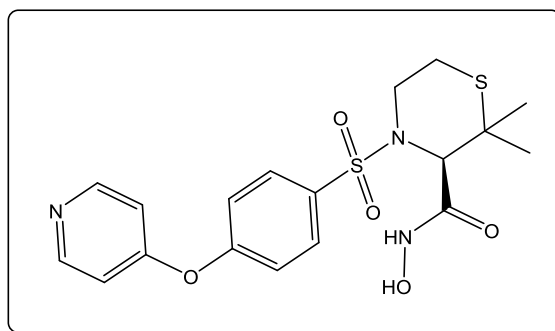


Figura 1.22: Estrutura química do *Prinomastat*. (MM: 423,50 g/mol)

Os **derivados de tetraciclina** (figura 1.23) inibem a atividade e a produção das MMPs. Estes inibem as collagenases (MMPs-1,-3 e -13) e as gelatinases (MMP-2, -9) através de vários mecanismos^{35,68}:

- Bloqueio da atividade das MMPs, pela ação quelante do íon de zinco;
- Interfere na ativação proteolítica das pró-MMPs;
- Reduz a expressão das MMPs;
- Protege a MMP da degradação proteolítica ou oxidativa.

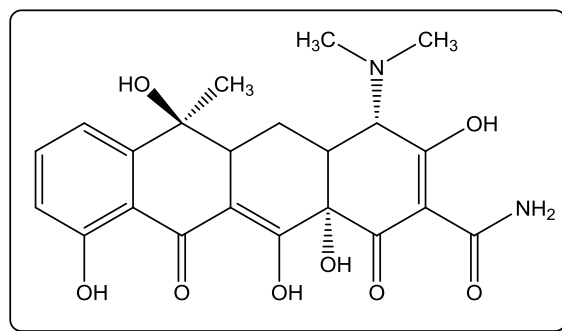


Figura 1.23: Estrutura química de uma tetraciclina. (MM=444,44 g/mol)

Mais especificamente, para as MMPs envolvidas na pouca durabilidade das restaurações dentárias, têm sido estudados inibidores como a **clorohexidina** (CHX) e a **Galardina**.^{37,69}

A **clorohexidina** (figura 1.24) é um potente agente antimicrobiano catiônico⁷⁰ e um inibidor de MMPs não específico, testado pelos seus efeitos antiproteolíticos.⁷¹ No entanto é uma molécula grande e solúvel em água, limitando os seus benefícios a longo prazo.⁷² *In vitro*, a clorohexidina a 2% foi capaz de diminuir a atividade das MMPs, com um armazenamento de 6 meses⁷³ e quando foi aplicada *in vivo* como pré-tratamento, as camadas híbridas mantiveram-se intactas após 6 meses, permanecendo estáveis ao fim de 14 meses, não havendo sinais de degradação.¹⁶ Em contraste, quando a CHX foi adicionada juntamente com o primer, durante os primeiros 6 meses, o sistema manteve-se estável, mas após 12 meses, verificou-se um aumento significativo da atividade das MMPs.^{37,74}

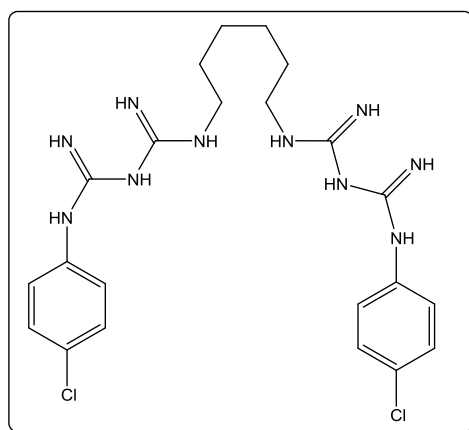


Figura 1.24: Estrutura química da clorohexidina (MM=505,55 g/mol)

Testes de microtensão da camada híbrida tratada com clorohexidina demonstraram que a ligação perde força entre 36% a 70% em 1 ano e 14 meses.¹⁶ A degradação foi confirmada através de microscopia eletrônica de transmissão comparando uma camada híbrida de *etch-and-rinse* padrão com uma camada híbrida tratada com 2% de clorohexidina.⁷⁵ Estudos comprovam o sucesso deste inibidor contra as atividades das MMPs-2, -8 e -9.⁷¹ Além disso, a dentina desmineralizada pode ligar-se à clorohexidina mais eficazmente do que a dentina mineralizada⁷⁶, sendo esta uma razão para a eficácia a longo prazo.

A **Galardina** (figura 1.25) é um agente quelante do íon de zinco e inibe as MMPs-1, -2, -3, -8 e -9.^{37,61} As superfícies pré-tratadas com 0,1 mM de Galardina mostraram uma degradação muito reduzida em comparação com as superfícies não tratadas.³⁷

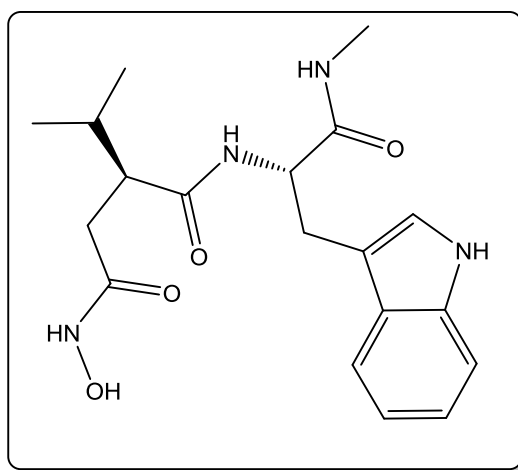


Figura 1.25: Estrutura química da Galardina (MM=374,44 g/mol)

Outros inibidores estudados são os **derivados de amônio quaternário** (QAC), que podem ligar a carga negativa do fosfato aos grupos carboxílicos da hidroxiapatite ou do colagênio.⁷⁷ O **cloreto benzalcônio** (BAC) (figura 1.26) é um agente tensioativo catiónico azotado e é utilizado em odontologia, não demonstrando efeitos adversos.⁷⁸ Demonstra inibição das MMPs, que depende da combinação entre a concentração de BAC e a formulação do adesivo, podendo haver comportamentos diferentes em termos da estabilidade da ligação.¹⁵

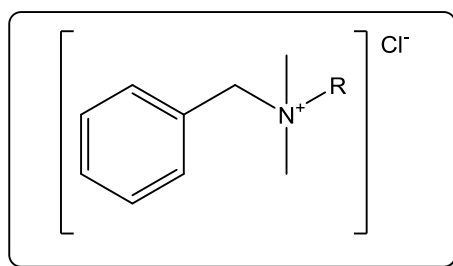


Figura 1.26: Estrutura química do cloreto de benzalcônio, onde R=C₈H₁₇ ou R= C₁₈H₃₇.

Os inibidores de MMPs não polimerizáveis, como é o caso da clorhexidina e o BAC, são conhecidos por se ligarem à dentina electrostaticamente, comprometendo os seus benefícios antiproteolíticos.⁷⁹ Tem sido proposto a utilização de compostos polimerizáveis, no entanto, as interações entre os inibidores e os monómeros da resina podem prejudicar as propriedades mecânicas.¹⁵

O interesse em desenvolver inibidores sintéticos de MMPs com capacidade seletiva, para bloquear a atividade descontrolada destas enzimas tem vindo a aumentar, mas apenas alguns fármacos seletivos e eficazes com as propriedades desejadas é que surgiram.⁸⁰ A homologia estrutural dos domínios catalíticos entre as MMPs é uma vantagem para desenvolver inibidores não específicos para MMPs presentes na dentina.

1.6 Monómeros

Um **polímero** é uma grande molécula constituída por ligações repetitivas de muitas unidades mais pequenas, os monómeros. O processo pelo qual os monómeros são unidos entre si e convertidos em polímeros é chamado de **polimerização**. Os monómeros utilizados em medicina dentária são geralmente líquidos e durante a polimerização da resina adesiva tornam-se sólidos. Um monómero pode ser dividido em três partes: um grupo polimerizável, um grupo funcional e um espaçador.⁵

O **grupo polimerizável** caracteriza-se pela presença de uma ligação dupla, capaz de formar radicais livres, que são fundamentais para o processo de polimerização. Os mais utilizados são os grupos acrilatos e metacrilatos (figura 1.27), que só diferem na sua reatividade, sendo que as ligações duplas dos acrilatos são as mais reativas. No entanto, ambos podem sofrer degradação hidrolítica.⁸¹



Figura 1.27: ácido acrílico (A) e metacrílico (B)

O **grupo funcional** tem propriedades hidrolíticas e pode melhorar as propriedades do monómero. Os grupos mais utilizados são fosfatos, ácidos carboxílicos e álcoois.⁵

Por fim, o **grupo espaçador** tem como função manter os dois grupos referidos anteriormente separados e tem grande influência sobre as propriedades do monómero, como a volatilidade, solubilidade e viscosidade. A polaridade da cadeia do espaçador determina a solubilidade do monómero em água, o seu carácter hidrófilo pode causar absorção de água e o seu tamanho influência a viscosidade, flexibilidade e a reatividade dos grupos.^{5,81}

Os monómeros utilizados na restauração dentária devem apresentar um alto rácio de radicais livres, necessários para a polimerização da resina e serem estáveis nas duas formas:

monómero e polímero. Como os adesivos são soluções aquosas, de acetona ou de etanol, os monómeros deve ser solúveis nestes solventes, no entanto apresentam um efeito plastificante, uma vez que são hidrofóbicos, evitando a permeação de água na camada híbrida. Por fim, estes monómeros devem ter uma toxicidade e citotoxicidade oral baixa.⁸¹

Capítulo II Discussão de Resultados

2.1 Objetivo

Ao longo deste trabalho pretendeu-se sintetizar possíveis compostos inibidores de metaloproteínas de matriz (MMPs). Anteriormente, outros colegas efetuaram estudos de uma biblioteca de compostos através de cálculos computacionais, sobre a sua afinidade para as MMPs estudadas, pelo que se procedeu à sua síntese.

Os compostos sintetizados são derivados de cloreto de 4-vinilbenzilo por reação com o brometo de benzilo ou o 4-cianofenol. Estes dois componentes foram interligados por uma cadeia carbonada R, denominada por espaçador (figura 2.1).

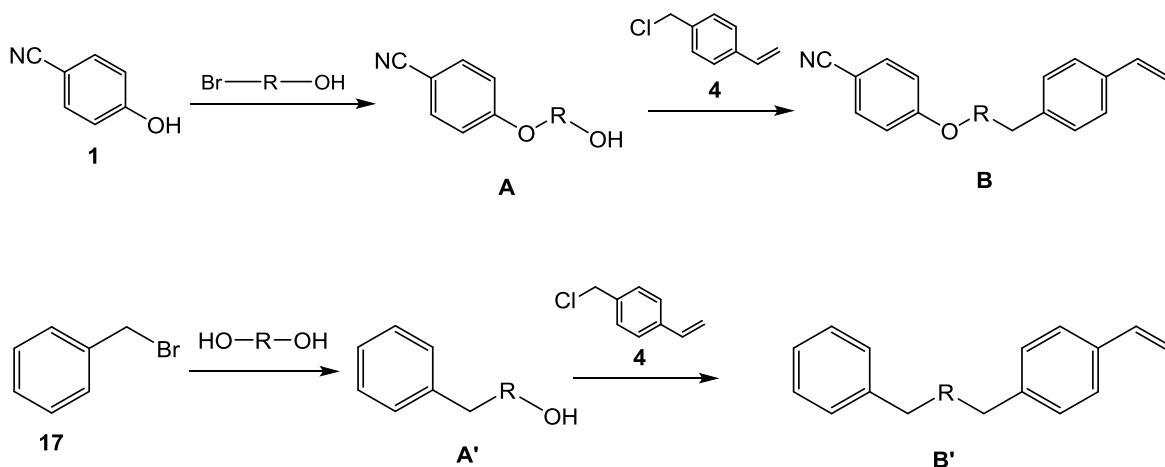


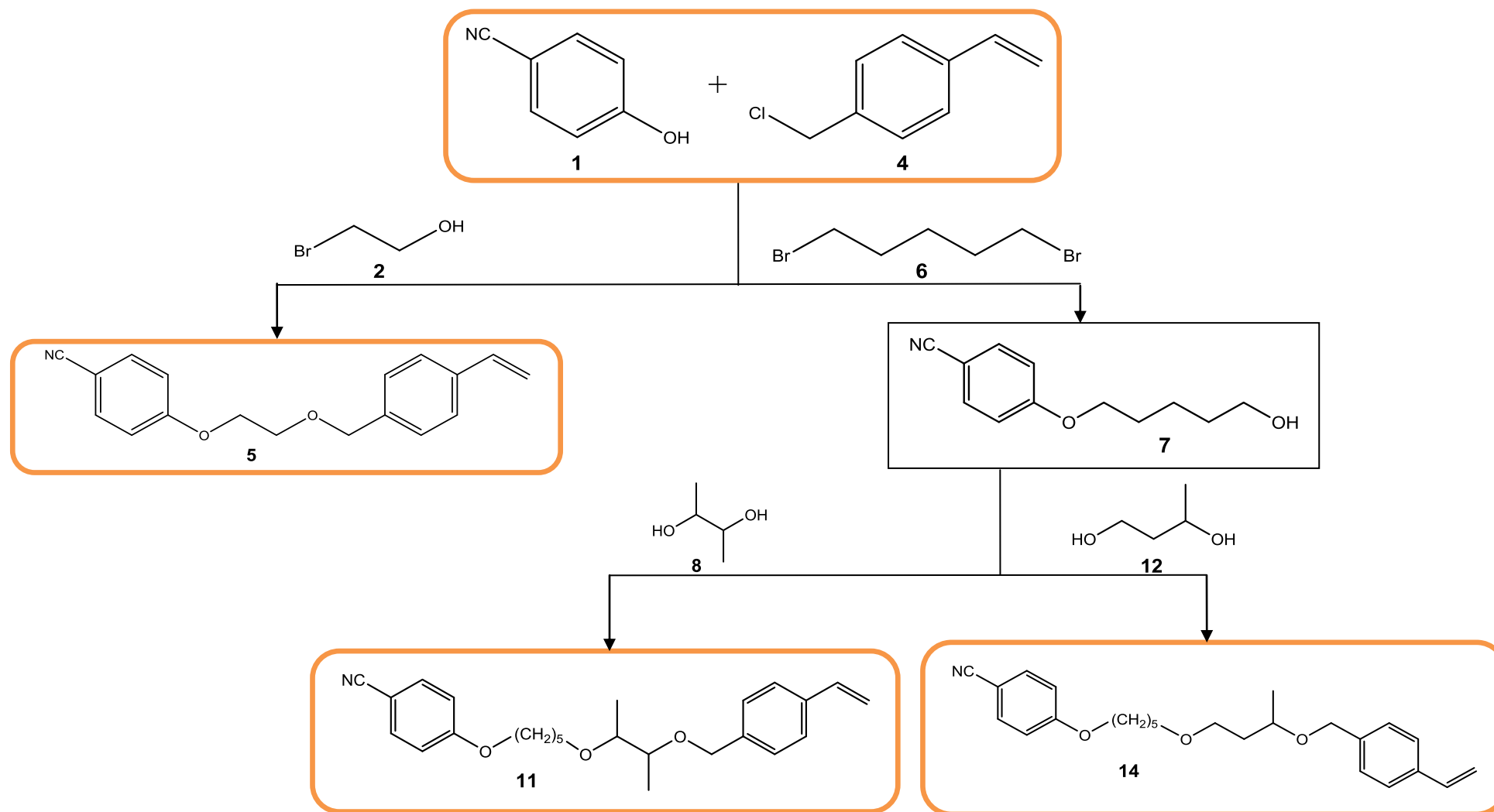
Figura 2.1: Esquemas reaccionais gerais. Inicialmente ocorre uma reação de substituição em que o grupo OH é o nucleófilo, formando-se o composto **A** (3, 9 e 13) e **A'** (19, 21 e 23). De seguida ocorre novamente uma substituição do grupo cloro do cloreto de 4-vinilbenzilo, pela molécula **A** ou **A'**, formando-se o composto **B** (5, 11 e 14) ou **B'** (20, 22 e 24), respetivamente.

Posteriormente realizou-se os respetivos testes enzimáticos, para o estudo da atividade inibitória desses compostos. As enzimas estudadas foram as MMP-1, -2, -8, -9 e -13 e as concentrações de inibidor estudadas foram a 1 mM, 0,1 mM, 0,05 mM e 0,01 mM.

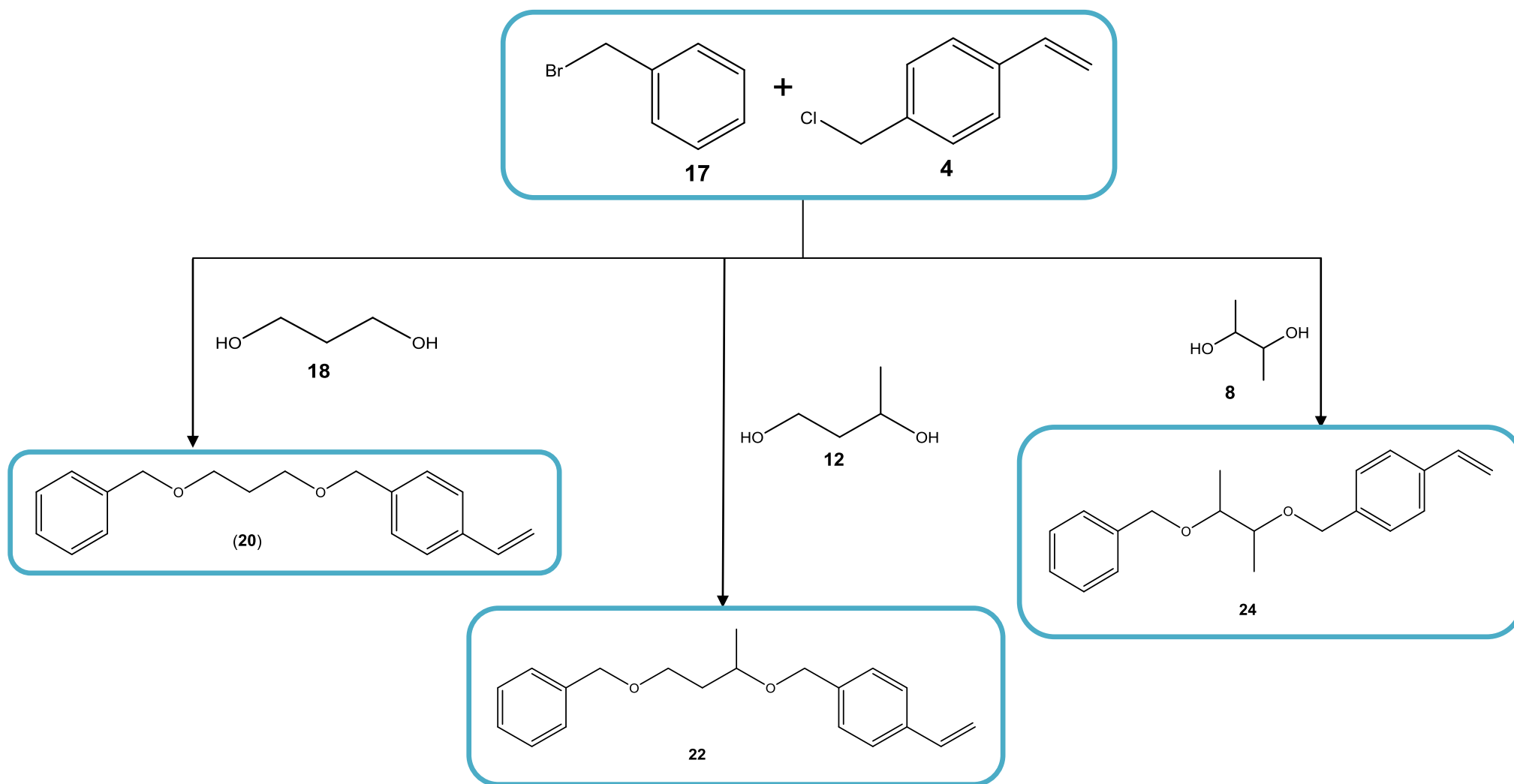
Os resultados seguidamente apresentados estão divididos em duas secções: síntese e testes enzimáticos.

2.2 Esquemas gerais das reações

2.2.1 Reações de 4-cianofenol (1) com cloreto de 4-vinilbenzilo (4)



2.2.2 Reações de brometo de benzilo (17) com cloreto de 4-vinilbenzilo (4)



2.3 Síntese

Os novos compostos foram obtidos fazendo reagir o grupo hidroxilo, na presença de uma base, com um halogeneto, onde os iões de cloreto ou brometo são bons grupos de saída. A base tem a função de retirar o hidrogénio do grupo hidroxilo, havendo a libertação de moléculas de hidrogénio (H_2) e o oxigénio, que fica com uma carga negativa, ataca o reagente halogenado. No esquema seguinte encontra-se representado o mecanismo geral das reacções (figura 2.2).

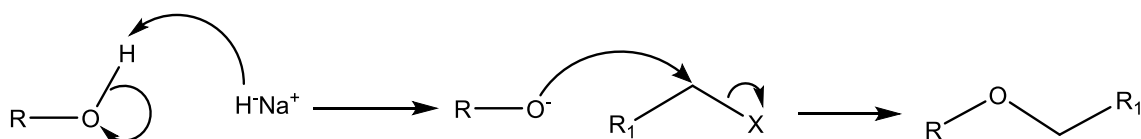


Figura 2.2: Mecanismo geral da reacção. A base (NaH) retira o protão do grupo hidroxilo do álcool ($R-OH$), ficando este com uma carga negativa capaz de reagir com outra molécula, que possui o grupo de saída brometo ou cloreto (R_1-X)

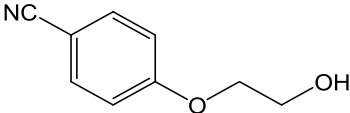
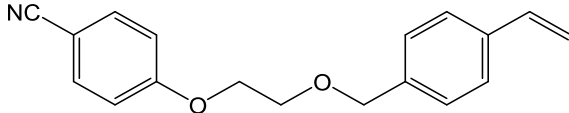
Todas as reacções foram realizadas com o mesmo procedimento experimental. A evolução das reacções foi acompanhada por cromatografia em camada fina. Para isso, observou-se as placas de sílica sob a luz ultravioleta, a um comprimento de onda de 254 nm, uma vez que os compostos de interesse possuem pelo menos um anel aromático, tornando-os visíveis sob esta radiação. Tendo-se observado o fim da reacção ou a sua não evolução, realizou-se a extração do produto e a sua purificação por cromatografia de coluna em sílica-gel, tendo como eluentes uma mistura de hexano (Hex): acetato de etilo (AcOEt). Todos os compostos foram caracterizados recorrendo a métodos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), de infravermelho (IV) e ponto de fusão.

No primeiro processo de síntese utilizou-se 4-cianofenol (**1**) e 2-bromoetanol (**2**), na presença de uma base (K_2CO_3), em diclorometano. A mistura reaccional foi mantida em refluxo, formando-se o intermediário 2-(4-cianofenoxi)etanol (**3**). A reacção foi monitorizada por cromatografia em camada fina (1:2 Hex/AcOEt), sendo que ao final de 30 horas não foi visível a evolução da reacção, tendo esta atingindo o seu estado de equilíbrio, devido à presença de duas manchas, o material de partida e o produto, sob a luz ultravioleta. Depois da purificação do produto, através de uma coluna de sílica-gel e posterior secagem na linha de vácuo, para retirar quaisquer vestígios de solvente, obteve-se um rendimento de 61,2% de um sólido branco, que foi analisado por RMN, tendo-se confirmado que é o composto pretendido. Este sólido foi dissolvido em DMF e sob agitação foi adicionado NaH. A mistura reaccional em agitação foi colocada sob árgon e mergulhada num banho de gelo, durante 3 horas. De seguida, adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) e aqueceu-se a mistura reaccional a 60°C, durante 22 horas. A reacção foi controlada por cromatografia em camada fina (5:1 Hex/AcOEt), tendo-se a verificado que a reacção não foi completa. No final obteve-se o 4-(2-((4-

vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo (**5**), sob a forma de um óleo amarelo e com um rendimento de 52,4%.

Os compostos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de próton (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN) e a atribuição dos sinais foi complementada através de espectros bidimensionais (DEPT, COSY e HMQC). Na tabela 2.1 apresentam-se os sinais de RMN obtidos, bem como as bandas de infravermelho para estes dois compostos. Do composto **3** para o **5**, verificou-se a adição dos prótons e carbonos relativos ao cloreto de 4-vinilbenzilo e um desvio do sinal relativo aos prótons da cadeia carbonada. Este desvio era previsível porque o composto **3** tem os prótons do CH_2 mais blindados devido à presença do grupo hidroxilo que é muito eletronegativo. Este desvio é maior do que no caso do desvio dos CH_2 do composto **5**, que possui um anel aromático, rico em elétrons, aumentando a densidade eletrônica em torno do oxigênio. Também observou-se que os prótons envolvidos na ligação dupla do composto **5** possuem sinais característicos, um duplete de dupletos a 6,71 ppm relativo ao CH e dois dupletos a 5,75 ppm e 5,25 ppm relativo ao CH_2 . Estes dois sinais apoiam a estrutura proposta, em que cada próton sente um ambiente químico e magnético distinto. Em relação aos espectros de carbono observou-se o sinal característico do CN a 119,1 ppm. Com o auxílio da técnica de infravermelho foi possível confirmar a presença do grupo hidroxilo do composto **3**, com uma banda característica a $3504,8\text{ cm}^{-1}$. Também observou-se uma banda característica do CN a $2224,9\text{ cm}^{-1}$. Quando é feita a comparação deste espectro com o espectro do composto **5**, evidenciou-se a ausência da banda do grupo hidroxilo e a presença de uma banda a $1702,8\text{ cm}^{-1}$, banda relativa à ligação dupla terminal.

Tabela 2.1: Caracterização dos compostos 2-(4-cianofenoxi)etanol, **3**, e 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**.

Estrutura	 <p style="text-align: center;">3</p>	 <p style="text-align: center;">5</p>
Rendimento (%)	61,2	52,4
^1H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,59 (2H, d, $J=8,8\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 6,98 (2H, d, $J=8,8\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 4,14 (2H, t, $J=4$, $\text{CH}_2\text{-O}$) 4,01 (2H, t, $J=4$, $\text{CH}_2\text{-OH}$) 2,13 (1H, s, OH)	7,57 (2H, d, $J=8,9\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 7,40 (2H, d, $J=8,0\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 7,31 (2H, d, $J=8,0\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 6,97 (2H, d, $J=8,8\text{ Hz}$, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 6,71 (1H, dd, $J_1=17,6\text{ Hz}$, $J_2=10,9\text{ Hz}$, CH=CH_2) 5,75 (1H, d, $J=17,6\text{ Hz}$, CH=CH_2) 5,25 (1H, d, $J=10,9\text{ Hz}$, CH=CH_2) 4,61 (2H, s, O-CH_2) 4,18 (2H, t, $J=4\text{ Hz}$, O-CH_2) 3,83 (2H, t, $J=4\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-O}$)

^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm)	161,9 ($\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--O}$) 134,1 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 119,1 (CN) 115,3 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 104,4 ($\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--CN}$) 69,6 ($\text{CH}_2\text{--O}$) 61,1 ($\text{CH}_2\text{--OH}$)	162,1 ($\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--O}$) 137,3 ($\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--CH}_2$ e $\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--CH}$) 136,4 (CH=CH_2) 133,9 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 128,0 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 126,3 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 119,2 (CN) 115,3 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 114,0 (CH=CH_2) 104,2 ($\text{C}_{(\text{Ar})}\text{--CN}$) 73,2 (O--CH_2) 68,1 ($\text{CH}_2\text{--O}$) 67,8 (O--CH_2)
IV (KBr (3) , NaCl (5)) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	3504,8 (OH) 2941,3 e 2848,0 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 2224,9 (CN) 1604,0 e 1507,5 ($\text{C=C}_{(\text{Ar})}$) 1463,0 (CH_2) 1263,7 (O--CH_2) 1040,7 ($\text{CH}_2\text{--OH}$)	3055,2 - 2986,6 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$) 2226,9 (CN) 1702,8 (C=C) 1606,7 e 1509,0 ($\text{C=C}_{(\text{Ar})}$) 1422,1 (CH_2) 1265,3 (O--CH_2) 1108,5 ($\text{CH}_2\text{--O--CH}_2$)

As duas sínteses seguintes possuem o mesmo passo inicial, sendo que os produtos finais diferem do composto **3** na sua cadeia carbonada. Inicialmente juntou-se 4-cianofenol (**1**) com 1,5-dibromopentano (**6**) em acetona. A mistura foi colocada sob refluxo, na presença da base K_2CO_3 , durante quatro horas, conduzindo à formação do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo (**7**). O controlo da reacção foi feito por cromatografia em camada fina (9:1 Hex/AcOEt), onde se observa a presença de duas manchas, uma vez que o composto **7** é mais apolar do que o 4-cianofenol, tendo um fator de retenção (R_f) maior. Após a purificação do produto, através de uma coluna de sílica-gel, obteve-se um sólido branco, com um rendimento de 74,6%.

A síntese deste composto já se encontra descrita na literatura⁸², no qual foi utilizado um método auxiliado por micro-ondas. Assim comparou-se as caracterizações descritas e as obtidas, verificando-se diferenças nos intervalos de ponto de fusão. Uma vez que este tipo de método de caracterização permite obter uma ideia em relação ao grau de pureza do composto em estudo, pode-se colocar a hipótese de que o composto sintetizado se encontra com um elevado grau de pureza, uma vez que apresenta um intervalo de temperatura de 1°C (56°C - 57°C), em relação ao composto descrito que possui um intervalo de 3°C (53°C - 56°C).

Este composto **7** foi utilizado para duas sínteses. Na primeira, o 2,3-butanodiol (**8**), em DMF, na presença de NaH, foi deixado em agitação durante 30 minutos, num banho de gelo e em atmosfera inerte. De seguida adicionou-se o composto **7** à reacção, colocando-a à temperatura de 60°C , durante 24 horas e mantendo a agitação. O seu acompanhamento foi realizado por cromatografia em camada fina (1:2 Hex:AcOEt) e verificou-se que o composto **7** apresenta um R_f maior do que o composto pretendido. Após a respetiva extração e purificação obteve-se um líquido transparente, 4-((5((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**9**), onde o rendimento reaccional foi de 56%.

Os espectros de RMN dos compostos **7** e **9** foram comparados. Começando pelo espectro de ^1H RMN, os prótons aromáticos de ambos encontram-se na mesma zona do espectro, em campos baixos. No composto **7**, os prótons envolvidos na ligação $\text{CH}_2\text{--Br}$ encontram-se representados como um tripleto a 3,44ppm, que é desmultiplicado em dois

multipletos, cada um a integrar comparativamente para um próton, no espectro do composto **9**. Estes prótons podem estar a sofrer ambientes químicos e magnéticos diferentes, uma vez que os grupos metilo (CH_3) do diol são grupos volumosos, podendo haver algum tipo de interação destes com os prótons do CH_2 . Outra diferença presente entre os dois espectros é a ordem dos sinais relativos à ligação $\text{CH}_{2(\text{A})}\text{-CH}_{2(\text{B})}\text{-CH}_{2(\text{C})}$ da cadeia carbonada (figura 2.3). Como se pode verificar na figura, os sinais relativos aos $\text{CH}_{2(\text{A})}$ e $\text{CH}_{2(\text{C})}$ trocam de posição ao compararmos os compostos **7** e **9**. No entanto esta troca de sinais está conforme a previsão descrita na literatura⁸³, comprovando-se assim que há uma alteração no ambiente magnético quando ocorre a substituição do átomo de bromo pelo átomo de oxigénio. Por fim, os grupos metilo apresentam um multiplete a campos mais altos, devido à presença das duas configurações (R e S) onde os prótons sentem ambientes químicos e magnéticos diferentes, havendo a sobreposição sinais relativos a cada configuração.

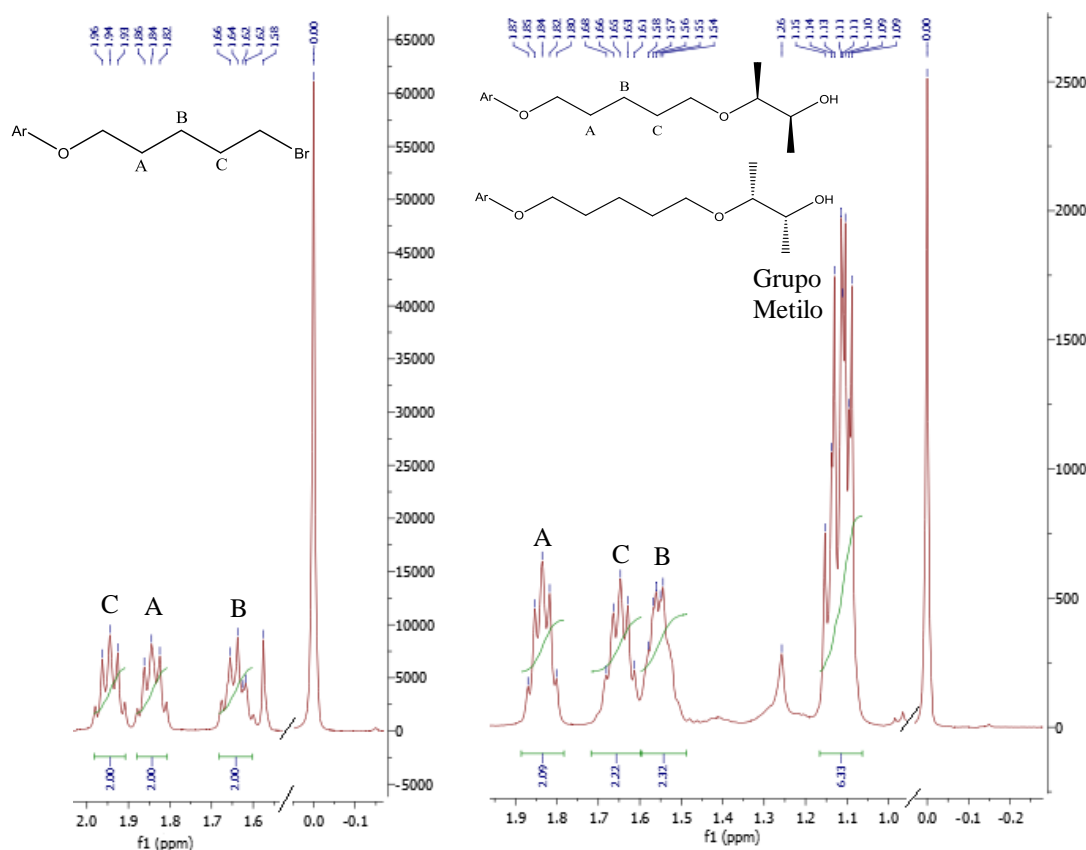


Figura 2.3: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN do composto **7** (à esquerda) e do composto **9** (à direita). Verifica-se que os sinais relativos aos $\text{CH}_{2(\text{A})}$ e $\text{CH}_{2(\text{C})}$ trocam de posição do primeiro para o segundo composto, devido à substituição do átomo de bromo pelo átomo de oxigénio.

Analisando o espectro de carbono destes dois compostos, verificou-se que, em ambos, o sinal relativo ao CN possui valores de desvio químico muito idênticos (119,2 ppm para o composto **7** e 119,3 ppm para o composto **9**). Observou-se também que o sinal do carbono envolvido na ligação $\text{CH}_2\text{-Br}$, no espectro do composto **7** encontra-se a 33,5 ppm enquanto, que no composto **9** este sinal passa a encontrar-se a 68,6 ppm, devido à troca do brometo pelo oxigénio. No entanto, e contrariamente ao ocorrido no espectro de próton, a ordem dos CH_2

envolvidos na cadeia carbonada mantém-se. Relativamente ao espectro do composto **9**, verificou-se que os grupos CH_3 possuem sinais distintos, isto devido ao ambiente químico e magnético que sentem, isto é, a aproximação em relação ao grupo hidroxilo. Também é de notar que este espectro possui sinais duplicados, isto é, os carbonos presentes no diol possuem dois sinais, com intensidades diferentes. Isto deve-se ao facto de que o 2,3-butanodiol utilizado ser racémico, ou seja, uma mistura das configurações R e S, o que também estará presente no produto final da reacção, visto que esta não envolve reacção em nenhum dos carbonos quirais.

Comparando o espectro de IV do composto **9**, verificou-se o aparecimento da banda característica do grupo hidroxilo, a $3454,8\text{ cm}^{-1}$, da banda da ligação CH-O , a $1172,4\text{ cm}^{-1}$ e da banda do grupo metilo, a $1376,7\text{ cm}^{-1}$ em relação ao material de partida **7**. Por fim também observou-se o desaparecimento das bandas relativas à ligação $\text{CH}_2\text{-Br}$, anteriormente a $1168,8\text{ cm}^{-1}$, $635,6\text{ cm}^{-1}$ e $548,9\text{ cm}^{-1}$.

Quando purificou-se o composto **9** por cromatografia em coluna, observou-se que a mistura reaccional apresentou três compostos em vez de dois como era esperado (material de partida, **7** e o produto, **9**). Este composto adicional foi recolhido e analisado por RMN e por IV. A distribuição dos carbonos e as correlações que foram possíveis de retirar dos espectros de COSY e de HMQC são idênticas aos espectros do composto **9**, tal como ocorre com o espectro de IV, que possui bandas muito idênticas, só omitindo as bandas relativas ao grupo hidroxilo. No entanto verificou-se duas grandes diferenças entre os espectros de protão dos dois compostos. Verificou-se que o sinal relativo ao grupo hidroxilo não está presente no espectro, indicando que este grupo sofreu alterações. Também se verificou uma diferença de integração dos sinais entre os dois compostos, isto é, fazendo a integração do sinal dos grupos metilo para 6 protões, verifica-se que o valor das integrações dos restantes sinais duplica em relação às integrações obtidas para o composto **9**, o que permitiu concluir que os dois grupos hidroxilo do diol reagiram com o composto **7**, formando o 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo (**10**), de acordo com o representado no mecanismo da figura 2.4 e com um rendimento de 1,9%. Como a molécula é simétrica, os dois grupos hidroxilo possuem valores de pKa idênticos, podendo o hidreto de sódio retirar o protão de qualquer um deles. Tal como ocorre na síntese do composto **9**, a carga negativa alojada no átomo de oxigénio torna-se suficientemente nucleófilo para atacar o metileno do grupo $\text{CH}_2\text{-Br}$, havendo a expulsão do ião brometo, numa reacção de substituição. Uma vez que o pKa do outro grupo hidroxilo não sofre variações e como a base utilizada é uma base forte, esta volta a desprotonar o grupo hidroxilo e o processo de substituição volta a ocorrer, formando-se assim o composto disubstituído.

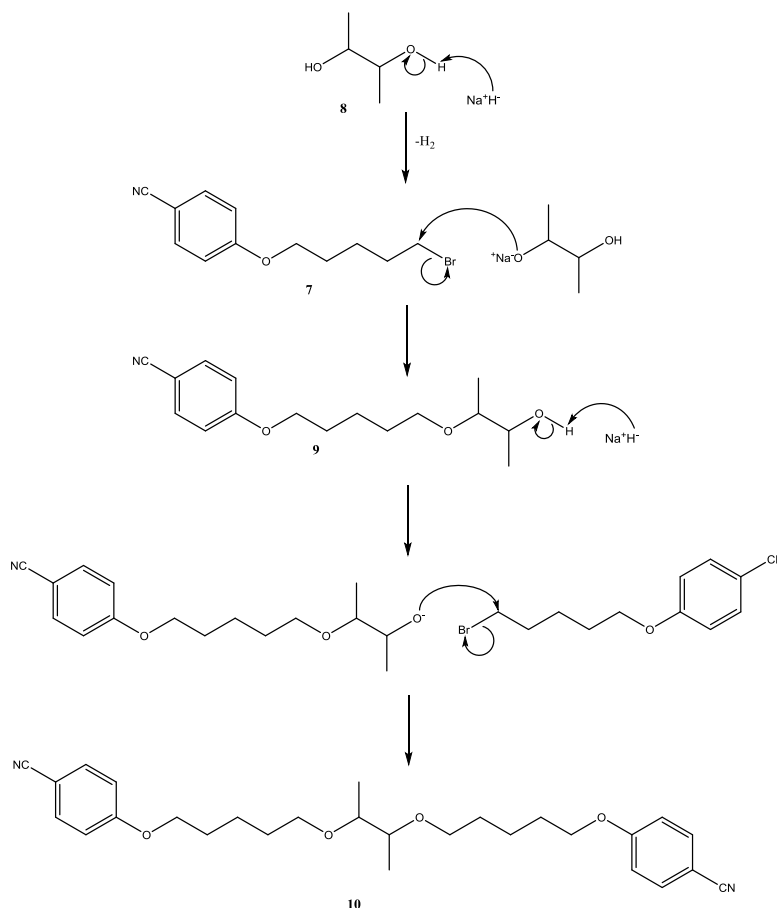


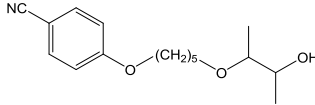
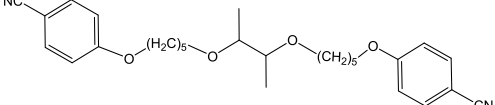
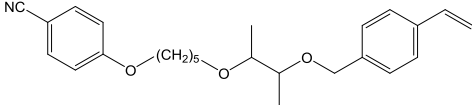
Figura 2.4: Mecanismo reaccional para síntese dos compostos **9** e **10**. Partindo do composto **8** desprotonado, ocorre a formação do composto **9**, pela substituição do brometo no composto **7**. De seguida, o hidreto desprotona novamente o grupo hidroxilo do composto **9**, voltando a haver a reação com o composto **7**, formando-se assim o composto **10**.

Uma possível forma de evitar o aparecimento do composto **10** seria alterar o número de equivalentes de base utilizados. Para esta síntese utilizaram-se dois equivalentes de base para um equivalente de composto **7**, havendo assim um excesso de base que não é totalmente consumido na reação de desprotonação do diol. Diminuindo a quantidade de hidreto de sódio utilizada, possivelmente este seria totalmente consumido neste passo e não ocorreria a segunda desprotonação do composto.

Por fim, sintetizou-se o composto pretendido para ser utilizado nos posteriores ensaios enzimáticos. Para isso, adicionou-se ao composto sintetizado anteriormente (**9**), dissolvido em DMF, a base NaH, deixando-se reagir durante 30 minutos, sob agitação e em atmosfera inerte, num banho de gelo. De seguida adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo, **4** e colocou-se o balão em aquecimento a uma temperatura de 60°C. O acompanhamento da reação foi realizado recorrendo a cromatografia em camada fina, sendo as placas de sílica eluídas num eluente 5:1 Hex:AcOEt. Passadas quatro horas reacionais, realizou-se a extração do produto e respetiva purificação por coluna de sílica-gel. No final da purificação obteve-se um óleo amarelo, com um rendimento de 20,4%, tendo-se verificado ser o 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**11**).

Na tabela 2.2 encontra-se representada a caracterização dos compostos **9**, **10** e **11** correspondentes a esta síntese. Analisando o espectro de próton do composto **11** e comparando-o com o composto precursor (**9**) verificou-se a adição dos sinais relativos aos prótons do segundo anel aromático e da ligação dupla. Em relação ao espectro de carbono, os sinais relativos aos grupos metilo do composto **11** têm valores de desvios químicos muito próximos, indicando que houve uma alteração no seu ambiente eletrônico. Pelo espectro de IV observou-se a omissão da banda do grupo hidroxilo, presente no composto inicial **9**, como esperado.

Tabela 2.2: Caracterização do composto 4-((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (9), 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo (10) e 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butano-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (11).

Estrutura	 (9)	 (10)	 (11)
Rendimento (%)	56	1,9	20,4
¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,57 (2H, d, J=8,8 Hz, CH _(Ar)) 6,93 (2H, d, J=8,8 Hz, CH _(Ar)) 4,01 (2H, t, J=6,4 Hz, O-CH ₂) 3,85 (1H, dd, J ₁ =6,4 Hz, J ₂ = 3,4 Hz, CH-CH ₃) 3,59 - 3,53 (1H, m, CH ₂ -O) 3,47 - 3,41 (1H, m, CH ₂ -O) 3,37 - 3,34 (1H, m, CH-CH ₃) 2,21 (1H, s, OH) 1,87 - 1,80 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,68 - 1,61 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,58 - 1,54 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,15 - 1,09 (6H, m, CH ₃)	7,56 (4H, d, J= 8,9 Hz, CH _(Ar)) 6,92 (4H, d, J= 8,9 Hz, CH _(Ar)) 4,00 (4H, t, J= 6,4 Hz, O-CH ₂) 3,58 - 3,52 (2H, m, CH ₂ -O) 3,48 - 3,43 (2H, m, CH ₂ -O) 3,42 - 3,37 (2H, m, CH) 1,86 - 1,78 (4H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,65 - 1,59 (4H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,57 - 1,50 (4H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,09 (6H, d, J= 6,1 Hz, CH ₃)	7,55 (2H, d, J=8,9 Hz, CH _(Ar)) 7,36 (2H, d, J=8,0 Hz, CH _(Ar)) 7,30 (2H, d, J=8,0 Hz, CH _(Ar)) 6,90 (2H, d, J= 7,3 Hz, CH _(Ar)) 6,73 - 6,66 (1H, m, CH=CH ₂) 5,72 (1H, d, J= 17,5 Hz, CH=CH ₂) 5,22 (1H, d, J=10,9 Hz, CH=CH ₂) 4,62 - 4,52 (2H, m, O-CH ₂) 3,99 - 3,94 (2H, m, O-CH ₂) 3,55 - 3,51 (1H, m, CH-CH ₃) 3,48 - 3,43 (2H, m, O-CH ₂) 3,39 - 3,38 (1H, m, CH-CH ₃) 1,84 - 1,78 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,63 - 1,61 (2H, d, J= 6,1 Hz, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,57 - 1,52 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,19 - 1,10 (6H, m, CH ₃)
¹³ C RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	162,4 (C _(Ar) -O) 133,9 (CH _(Ar)) 119,3 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 103,7 (C _(Ar) -CN) 80,6 e 78,7 (CH-CH ₃) 71,2 e 69,2 (O-CH-CH ₃) 68,6 (CH ₂ -O) 68,2 (O-CH ₂) 29,7 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 22,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 18,5, 17,7, 15,4 e 13,6 (CH ₃)	162,4 (C _(Ar) -O) 133,9 (CH _(Ar)) 119,3 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 103,7 (C _(Ar) -CN) 77,7 (CH-CH ₃) 69,3 (CH ₂ -O) 68,3 (O-CH ₂) 29,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 22,7 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 14,9 (CH ₃)	162,4 (C _(Ar) -O) 138,6 (C _(Ar) -CH) 136,8 (C _(Ar) -CH ₂) 136,6 (CH=CH ₂) 133,9 (CH _(Ar)) 127,8 (CH _(Ar)) 126,1 (CH _(Ar)) 119,3 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 113,6 (CH=CH ₂) 103,7 (C _(Ar) -CN) 78,6 e 78,0 (CH-CH ₃) 77,7 e 77,2 (CH-CH ₃) 71,1 e 70,8 (O-CH ₂ -C _(Ar)) 69,3 e 69,1 (CH ₂ -O)

			68,3 (O-CH ₂) 29,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 22,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 15,9, 15,8, 15,1 e 15,0 (CH ₃)
IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm ⁻¹)	3454,8 (OH) 2938,5 e 2871,2 (CH _(Ar)) 2225,3 (CN) 1605,8 e 1508,6 (C=C _(Ar)) 1472,3 (CH ₂) 1376,7 (CH ₃) 1260,0 (C _(Ar) -O-CH ₂) 1172,4 e 1096,2 (CH-OH)	2940,7 e 2869,3 (CH _(Ar)) 2225,2 (CN) 1606,4 e 1509,4 (C=C _(Ar)) 1471,9 (CH ₂) 1374,7 (CH ₃) 1259,9 (C _(Ar) -O-CH ₂)	2937,4 e 2868,9 (CH _(Ar)) 2224,3 (CN) 1605,7, 1572,9 e 1508,8 (C=C _(Ar)) 1709,2 (CH=CH ₂) 1470,3 (CH ₂ e CH ₃) 1259,5 (O-CH ₂) 1172,1 (CH-O)

O 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, **7**, também foi utilizado na obtenção do composto 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**13**), para o efeito fez-se reagir o 1,3-butanodiol (**12**), em DMF, com NaH durante três horas, sob árgon e num banho de gelo. De seguida juntou-se o composto **7** e colocou-se a reacção sob aquecimento, durante 24 horas. Para monitorizar a reacção por cromatografia em camada fina, utilizou-se uma mistura de 1:2 Hex/AcOEt como eluente, o que permitiu visualizar a presença dos dois compostos. Depois da purificação obteve-se o 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**13**), sob a forma de um líquido oleoso amarelo claro, tendo um rendimento de 61,4%.

Comparando os espectros de ^1H RMN dos compostos **7** e **13**, destaca-se a presença de um sinal a 2,73 ppm e a 1,20 ppm, relativos ao grupo hidroxilo e metilo presentes no composto **13**. Os sinais relativos aos CH_2 demonstraram um ligeiro desvio para campos altos, devido à presença do oxigénio na molécula. Como ocorrido no caso anterior, houve a alteração da ordem nos sinais relativos à cadeia carbonada, devido à substituição do átomo de bromo pelo átomo de oxigénio do diol. Ainda no espectro do composto **13** verificou-se que o sinal relativo ao $\text{O}-\text{CH}_2$ do diol, encontra-se desdobrado, tendo um multiplete a 3,68 - 3,64 ppm e a 3,62 - 3,58 ppm (figura 2.5). Estes sinais podem ser explicados pela existência de dois ambientes magnéticos em que estes prótons estão em contacto, pela influência do átomo de oxigénio e a nuvem eletrónica do grupo metilo.

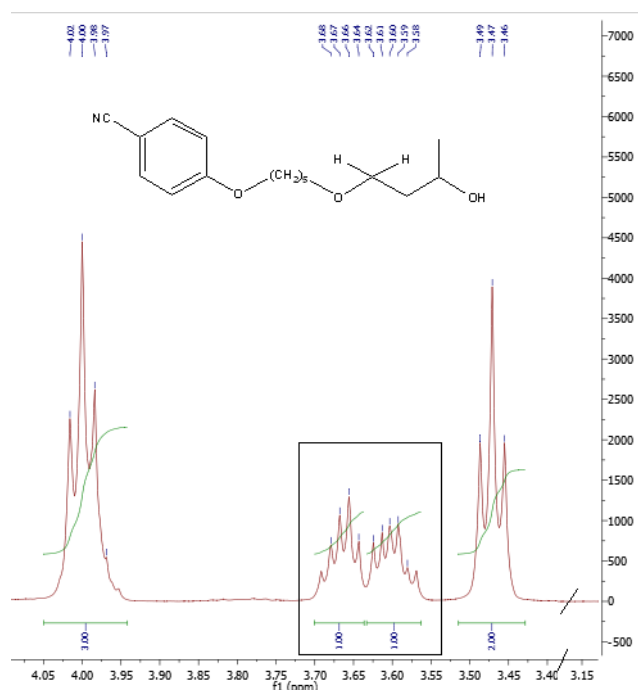


Figura 2.5: Fragmento do espectro de ^1H RMN do composto **13**. Os multipletos assinalados a 3,68 - 3,64 ppm e a 3,62 - 3,58 ppm são relativos aos prótons do $\text{O}-\text{CH}_2$.

Os grupos hidroxilo presentes no 1,3-butanodiol são suscetíveis à desprotonação, por parte da base NaH. Assim, para além da formação do composto pretendido, **13**, poderá haver a formação de um composto secundário, o 4-((5-((4-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**14**), que segundo o espectro de ^{13}C RMN é minoritário, devido ao aparecimento de um sinal com

uma intensidade mais baixa junto aos sinais relativos aos carbonos do diol (figura 2.6). Assim, neste espectro, para além dos sinais relativos aos carbonos do anel aromático e cadeia carbonada, que têm desvio iguais em ambos os compostos, observou-se a presença dos sinais a 75,7 ppm (CH-CH₃), 61,1 ppm (CH₂-OH), 38,7 ppm (CH-CH₂) e a 19,4 ppm (CH₃) relativos aos carbonos presentes composto **14**. Uma forma de evitar a formação deste composto minoritário seria realizar a proteção de um dos grupos hidroxilo, para favorecer a formação do composto **13**.

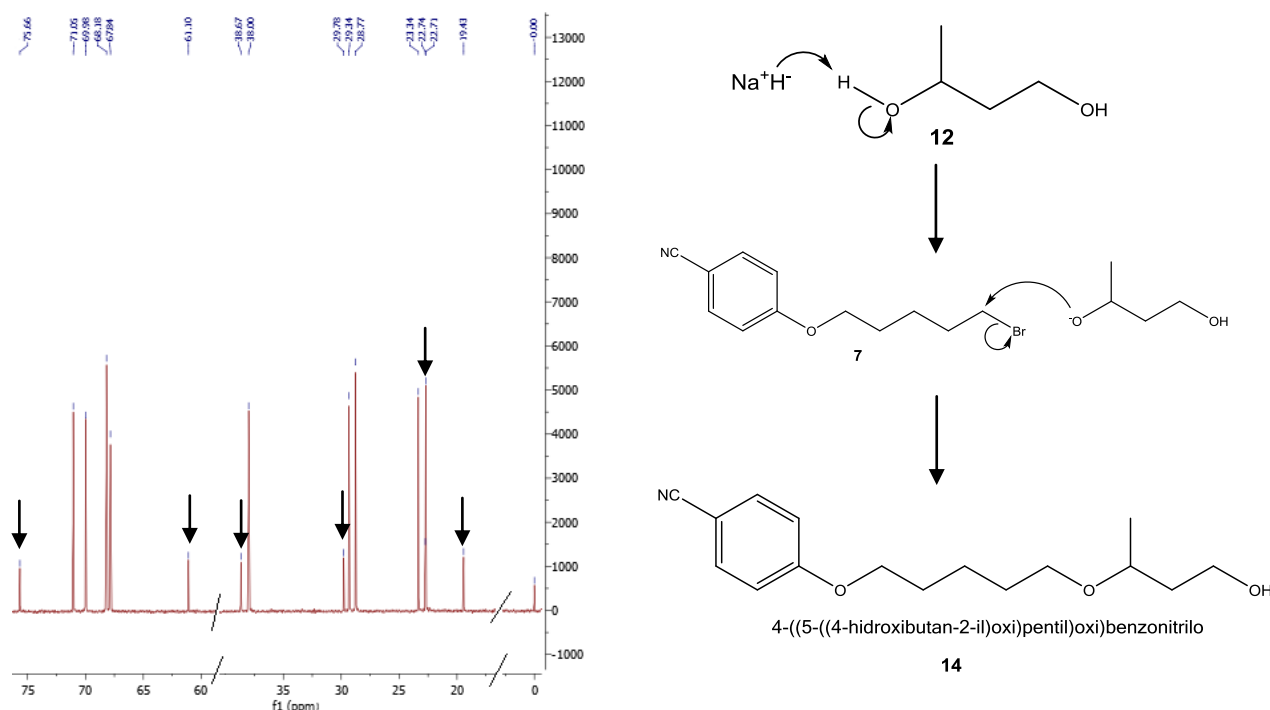


Figura 2.6: Fragmento do espectro de ¹³C RMN do composto **13** (à esquerda), onde os sinais assinalados são relativos ao composto minoritário **14**. Mecanismo reaccional para a formação do composto **14** (à direita).

Em relação ao espectro de IV verificou-se a presença do grupo hidroxilo, com uma banda a 3425,7 cm⁻¹, juntamente com o aparecimento das bandas dos grupos metilo, a 1471,7 cm⁻¹ e das bandas de vibração de CH₂-O-CH₂ e C(H)-O, a 1172,8 cm⁻¹ e 1112,9 cm⁻¹, respetivamente.

Para a síntese do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**15**) colocou-se o composto **13**, em DMF, a reagir com o NaH durante 12 horas, num banho de gelo e em atmosfera inerte. De seguida juntou-se o cloreto de 4-vinilbenzilo e deixou-se reagir durante 24 horas, a uma temperatura de 60°C. O controlo da reacção foi realizado por cromatografia em camada fina (3:1 Hex/AcOEt). No final do processo de purificação obteve-se um óleo amarelo, onde o rendimento obtido foi de 22,5%.

Comparando os espectros dos compostos **13** e **15** verificou-se que no espectro de ¹H RMN há uma desmultiplicação do sinal do grupo metilo, a 1,22 ppm, que tem uma integração para dois prótons e 1,15 ppm, integrado para um próton (figura 2.7 A). Pelo espectro de HMQC observou-se que estes dois sinais estão correlacionados com o mesmo sinal de carbono, a 19,8 ppm (figura 2.7 B). Por fim, através do espectro de COSY verificou-se que o sinal a 1,22 ppm tem uma correlação com o CH enquanto o sinal a 1,15 ppm possui uma correlação com os prótons da ligação O-CH₂ (figura 2.7 C).

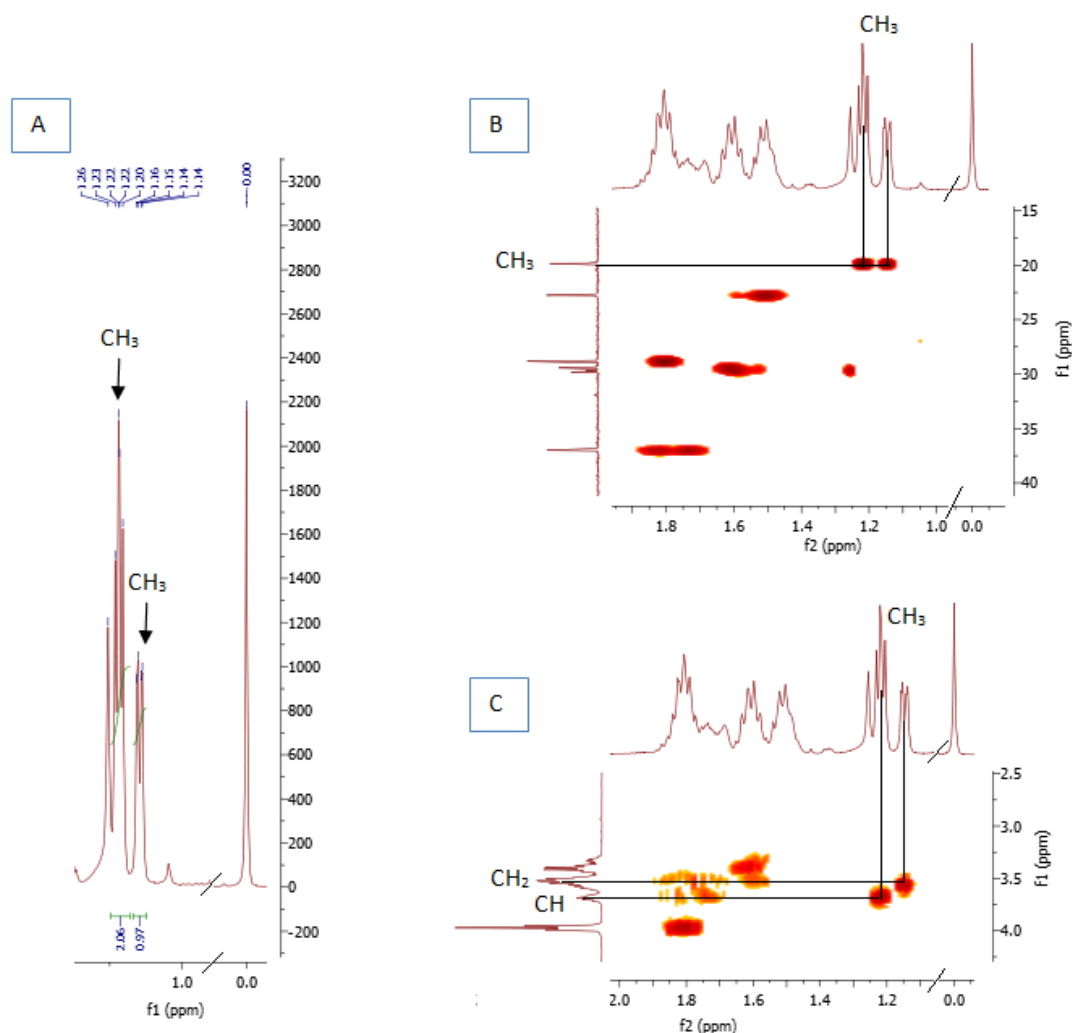
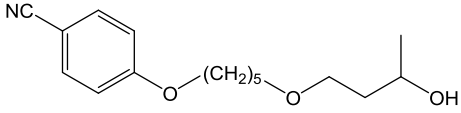
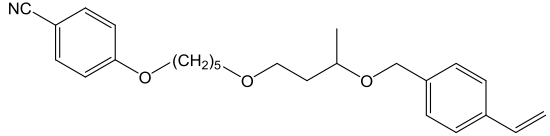


Figura 2.7: Fragmentos dos espectros RMN do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, composto **15**. **A**: ^1H RMN; **B**: HMQC; **C**: COSY

Uma vez que o espectro por COSY permite fazer a correlação entre prótons que distam entre si três ligações, uma possível explicação para a desmultiplicação do sinal do grupo metilo é baseada na configuração e rigidez da própria molécula, que é conferida pelo segundo anel. Assim, há possivelmente um favorecimento de interações entre os prótons do grupo metilo e os prótons do grupo OCH_2 . Analisando o espectro de IV observou-se a omissão da banda de vibração do grupo hidroxilo presente no composto **13** bem como, o aparecimento da banda da ligação dupla do vinil, a $1605,9\text{ cm}^{-1}$. Segue-se a caracterização dos compostos **13** e **15** de forma resumida (tabela 2.3).

Tabela 2.3: Caracterização dos compostos 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13** e 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

Estrutura	 <p style="text-align: center;">(13)</p>	 <p style="text-align: center;">(15)</p>
Rendimento (%)	61,4	22,5
¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,57 (2H, d, J=8,9 Hz, CH _(Ar)) 6,93 (2H, d, J= 8,9 Hz, CH _(Ar)) 3,99 (3H, q, J= 6,2 Hz, O-CH ₂ e CH-CH ₂) 3,68 - 3,64 (1H, m, O-CH ₂) 3,62 - 3,58 (1H,m, O-CH ₂) 3,47 (2H, t, J= 6,3 Hz, CH ₂ -O) 2,73 (1H, s, OH) 1,87 - 1,78 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,78 - 1,68 (2H, m, CH ₂ -CH) 1,68 - 1,61 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,58 - 1,48 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,20 (3H, d, J= 6,2 Hz, CH ₃)	7,56 (2H, d, J=8,9Hz, CH _(Ar)) 7,39 - 7,23 (4H, m, CH _(Ar)) 6,91 (2H, d, J=8,8 Hz, CH _(Ar)) 6,75 - 6,65 (1H,m, CH=CH ₂) 5,74 (1H, dd, J ₁ = 17,6 Hz, J ₂ =6,6 Hz, CH=CH ₂) 5,26 - 5,19 (1H, m, CH=CH ₂) 4,60 - 4,40 (2H, m, O-CH ₂) 3,97 (2H, t, J= 6,4 Hz, O-CH ₂) 3,74 - 3,62 (1H, m, CH-CH ₃) 3,60 - 3,32 (4H, m, CH ₂ -O-CH ₂) 1,84 - 1,78 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,78 - 1,66 (2H, m, CH ₂ -CH) 1,65 - 1,55 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,55 - 1,45 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,22 (2H, dd, J ₁ =6,0 Hz, J ₂ =4,6 Hz, CH ₃) 1,15 (1H, dd, J ₁ =6,1 Hz, J ₂ =1,6 Hz, CH ₃)
¹³ C RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	162,4 (C _(Ar) -O) 133,9 (CH _(Ar)) 119,3 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 103,7 (C _(Ar) -CN) 69,9 (O-CH ₂) 71,1 (CH ₂ -O) 68,2 (O-CH ₂) 67,8 (CH-CH ₂) 38,0 (CH ₂ -CH) 29, 3 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 23,3 (CH ₃) 22,7 (CH ₂ CH ₂ CH ₂)	162,6 (C _(Ar) -O) 136,9, 136,8, 136,6 e 136,5 (CH=CH ₂) 133,9 (CH _(Ar)) 128,6, 128,5 e 127,8 (CH _(Ar)) 126,2, 125,5, 125,4 e 125,3 (CH _(Ar)) 119,9 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 113,9, 113,7 e 113,6 (CH=CH ₂) 103,7 (C _(Ar) -CN) 72,5, 72,2 e 72,1 (CH-CH ₃) 70,7 (CH ₂ -O) 70,4 e 70,2 (O-CH ₂) 68,3 (O-CH ₂) 67,5, 67,1 e 67,0 (O-CH ₂) 37,0 (CH ₂ -CH) 29,8, 29,7 e 29,4 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 22,8 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 19,9 e 19,8 (CH ₃)
IV (NaCl) ν _{máx} (cm ⁻¹)	3425,7 (OH) 2940,2 e 2867,9 (CH _(Ar)) 2225,1 (CN) 1605,6 e 1508,6 (C=C _(Ar)) 1471,7 (CH ₂ e CH ₃) 1260,0 (O-CH ₂) 1172,8 (CH ₂ -O-CH ₂) 1112,9 (CH ₂ -OH)	2938,6 e 2864,9 (CH _(Ar)) 2224,5 (CN) 1509,1 (C=C _(Ar)) 1471,3 (CH ₂) 1259,3 (C _(Ar) -O-CH ₂) 1605,9 (C=C _(vinil)) 1171,9 (CH ₂ -O-CH ₂) 1302,3 (CH ₃)

Nestas duas últimas sínteses verificou-se alguns imprevistos. O primeiro foi o aparecimento de um composto secundário sempre que se utilizou o 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo (**7**), como material de partida. Este produto secundário foi detetado através da cromatografia em camada fina, uma vez que apresenta um R_f maior do que o composto **7**, como se pode observar na figura 2.8.

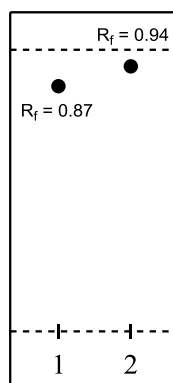


Figura 2.8: Esquema da placa de cromatografia em camada fina, eluída em 1:2 Hex:AcOEt. No ponto de aplicação 1 encontra-se o padrão do composto **7** e no ponto 2 o composto, tendo os seguintes R_f: 0,87 e 0,94, respectivamente.

Devido a esta diferença de R_fs, realizou-se o espectro de ¹H RMN deste composto, onde verificou-se o aparecimento de dois sinais, respectivamente, a 5,84 ppm e 5,05 ppm, sinais ausentes no espectro do composto **7** (figura 2.9). Comparando os espectros do ¹³C RMN dos compostos **7** e deste composto observou-se que o pico a 137,37 ppm, que não surge no espectro do primeiro composto, representa um grupo CH segundo o espectro de DEPT. No DEPT dos dois compostos também há uma grande diferença entre a distribuição dos picos CH₂, onde no espectro do composto **7** estes encontram-se predominantemente em campos fortes, enquanto no espectro do segundo composto estes picos encontram-se distribuídos ao longo do espectro. Com o auxílio dos espectros de COSY e HMQC foi possível fazer as correlações e as atribuições dos sinais, chegando-se à caracterização do composto 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo (**16**), onde verificou-se a presença de uma ligação dupla no final da cadeia carbonada.

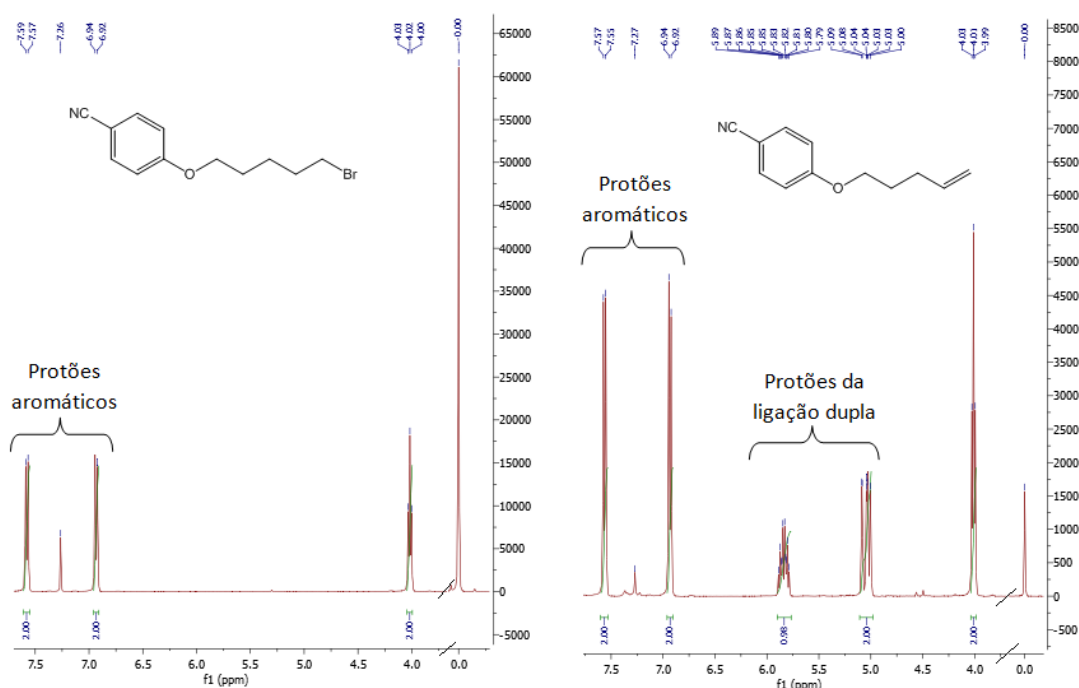


Figura 2.9: Fragmentos dos espectros de ¹H RMN dos compostos **7** (à esquerda) e **16** (à direita). Observa-se o aparecimento dos sinais relativos à ligação dupla, a 5,84 ppm e 5,05 ppm.

Assim, para a formação deste composto propõe-se o mecanismo reaccional ilustrado na figura 2.10. O hidreto do NaH ataca o hidrogénio do hidroxilo do diol, no entanto, se o tempo de reacção do NaH com o diol for curto, nem todo o hidreto de sódio é consumido, pelo que haverá um ataque aos prótons mais ácidos do composto **7**, favorecendo a formação da ligação dupla, através da expulsão do ião brometo (figura 2.10, B). Também ocorre a reacção esperada, ou seja, o ataque por parte do oxigénio com um par de electrões livres ao metileno ligado ao bromo havendo também a expulsão do ião brometo, formando assim os compostos **9** ou **13**, dependendo do diol utilizado. (figura 2.10, A).

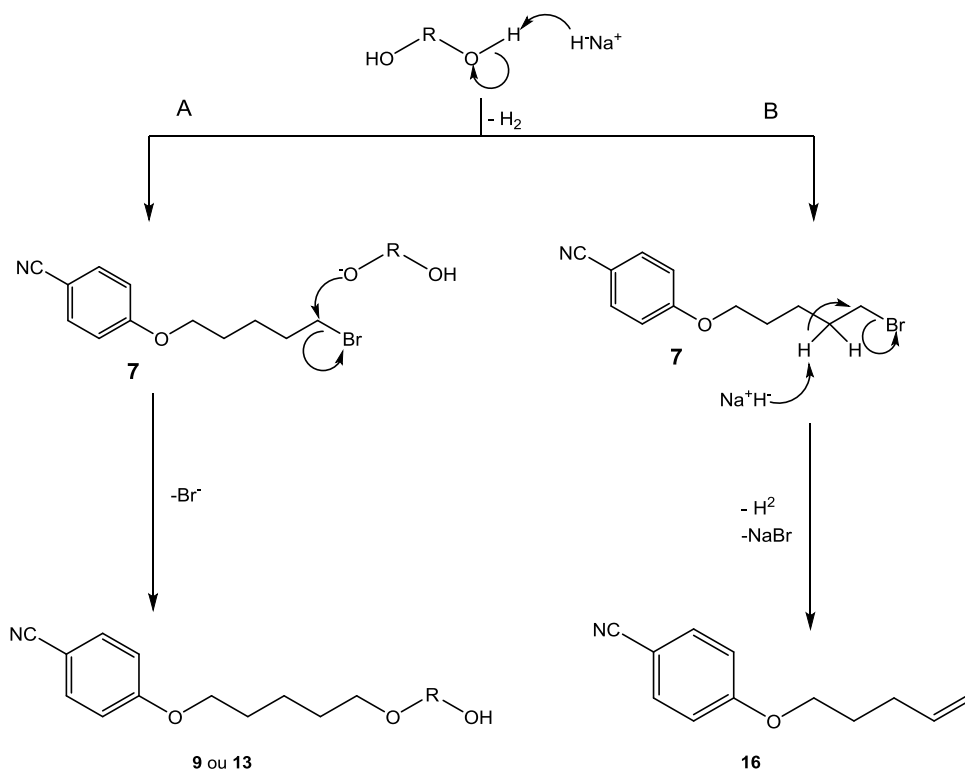
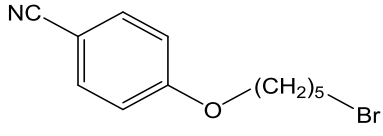
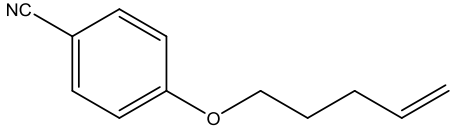


Figura 2.10: Mecanismo das reacções de síntese dos compostos **9**, caso seja utilizado o 2,3-butanodiol, ou do composto **13**, se for utilizado o 1,3-butanodiol (A) e do composto **16** (B). O hidreto de sódio retira o protão do grupo hidroxilo, do diol utilizado, deixando o oxigénio com um par de electrões livres capazes de atacar o composto **7**, expulsando o ião brometo, dando origem ao composto **9** ou **13**. Por outro lado, se o hidreto de sódio retirar um dos protões ácidos do composto **7**, dá-se a formação da ligação dupla e consequentemente ocorre a expulsão do ião brometo, formando o composto **16**.

Tendo-se efectuado alguns testes em que se variou o tempo de reacção entre o NaH e o diol, foi possível verificar uma dependência do rendimento da reacção com o tempo reaccional. Aumentando o tempo de reacção, verificou-se um aumento no rendimento de ambos os produtos, no entanto, os rendimentos dos compostos **9** e **13**, sofreram uma variação mais elevada do que a variação sofrida no rendimento do composto **16**. No entanto, este composto secundário irá ser utilizado nos ensaios enzimáticos. Na tabela seguinte encontra-se representada a caracterização dos compostos **7** e **16**.

Tabela 2.4: Caracterização dos compostos 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, **7** e 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, **16**.

Estrutura	 <p style="text-align: center;">(7)</p>	 <p style="text-align: center;">(16)</p>
Rendimento (%)	74,6	26,1
¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,58 (2H, d, J=8,8 Hz, CH _(Ar)) 6,93 (2H, d, J= 8,8 Hz, CH _(Ar)) 4,02 (2H, t, J= 6,3 Hz, O-CH ₂) 3,44 (2H, t, J= 6,7 Hz, CH ₂ -Br) 1,96 - 1,93 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,86 - 1,82 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,66 - 1,62 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂)	7,56 (2H, d, J=8,9 Hz, CH _(Ar)) 6,93 (2H, d, J= 8,9 Hz, CH _(Ar)) 5,90 - 5,77 (1H, m, CH=CH ₂) 5,09 - 5,00 (2H, m, CH=CH ₂) 4,01 (2H, t, J= 6,4 Hz, O-CH ₂) 2,24 (2H, q, J= 7,2 Hz, CH ₂ -CH) 1,95- 1,86 (2H, m, CH ₂)
¹³ C RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	162,3 (C _(Ar) -O) 133,9 (CH _(Ar)) 119,2 (CN) 115,2 (CH _(Ar)) 103,8 (C _(Ar) -CN) 67,9 (O-CH ₂) 33,5 (CH ₂ -Br) 32,3 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 28,1 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 24,7 (CH ₂ CH ₂ CH ₂)	162,4 (C _(Ar) -O) 137,4 (CH=CH ₂) 133,9 (CH _(Ar)) 119,3 (CN) 115,6 (CH=CH ₂) 115,2 (CH _(Ar)) 103,7 (C _(Ar) -CN) 67,5 (O-CH ₂) 29,9 (CH ₂ -CH) 28,1 (CH ₂)
IV (KBr (7) e NaCl (16)) ν _{máx} (cm ⁻¹)	2946,1 e 2859,6 (CH _(Ar)) 2226,8 (CN) 1604,2 e 1508,9 (C=C _(Ar)) 1466,2 (CH ₂) 1260,2 (C _(Ar) -O-CH ₂) 1168,8, 635,6 e 548,9 (CH ₂ -Br)	3077,8 e 2943,7 (CH _(Ar)) 2224,9 (CN) 1641,2 e 1573,9 (C=C _(Ar)) 1471,7 (CH ₂) 1259,6 (O-CH ₂)

Outro problema que surgiu foi uma possível alteração estrutural do reagente cloreto de 4-vinilbenzilo. Com o auxílio das técnicas de RMN, verificou-se que o espectro de ¹H RMN do composto formado é idêntico ao espectro do cloreto de 4-vinilbenzilo, tendo um sinal adicional a 2,32 ppm. Uma vez que no espectro de COSY este sinal não apresenta nenhuma correlação, verificando-se que este não sente a presença de outros prótons e com o espectro de HMQC verificou-se que este sinal não tem ligação a nenhum carbono. No espectro de carbono verificou-se um desvio do pico relativo ao CH₂-Cl a 46,2 ppm, do cloreto de 4-vinilbenzilo, para 64,7 ppm no composto formado. Assim colocou-se a hipótese de que o cloreto de 4-vinilbenzilo esteja a ser inativado, possivelmente através de uma substituição do grupo cloreto por um grupo hidroxilo, dando origem ao 4-vinilfenil metanol (**17**, figura 2.11).

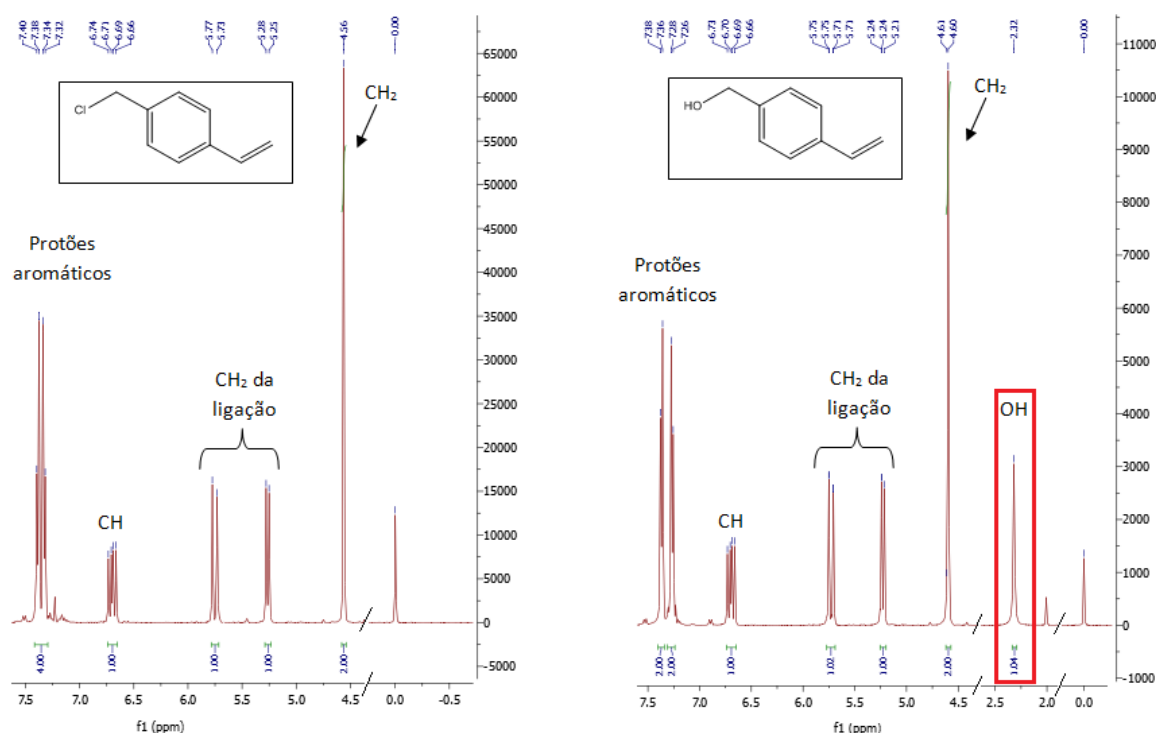


Figura 2.11: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN do cloreto de 4-vinilbenzilo, **4** (à esquerda) e do 4-vinilfenil metanol, **17** (à direita). Verifica-se que os sinais são todos idênticos, à exceção do sinal a 2,32 ppm, que é possivelmente relativo ao grupo hidroxilo.

Uma possível explicação para a origem deste grupo hidroxilo é a presença de água no sistema reaccional. No entanto, e de forma a testar esta hipótese, obtiveram-se os espectros de ^1H RMN do próprio cloreto de 4-vinilbenzilo, do solvente (DMF), do 1,3-butanodiol, **12**, e do 2,3-butanodiol, **8**, sendo que nenhum deles apresentou vestígios de água. O hidreto de sódio também não possuía água, pois apresentava uma coloração cinzenta e não branca, aspecto que teria na presença de água. Além disso, um frasco com uma pequena quantidade de hidreto de sódio foi colocado a secar na pistola a vácuo, onde não verificou-se uma diminuição significativa do seu peso, indicando assim que este não possui grandes quantidades de água. Com estes resultados, a única origem das moléculas de água seria o reagente limitante, ou seja, os compostos **9** e **13**. De facto, estes compostos são hidróscopicos, ou seja, absorvem água. Isso verificou-se quando o balão com o composto, que já tinha sido seco anteriormente, era levado à bomba de vácuo para secar, observando-se novamente um borbulhar.

Assim, devido a esta característica dos compostos, o sistema apresentaria uma quantidade suficiente de água para converter o cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) em 4-vinilfenil metanol (**17**). Para evitar esta reacção indesejada, os compostos **9** e **13** foram colocados a secar na bomba de vácuo, imediatamente antes de realizar a reacção, de forma a garantir uma quantidade mínima de água. O mecanismo da reacção proposto encontra-se representado na figura seguinte (figura 2.12).

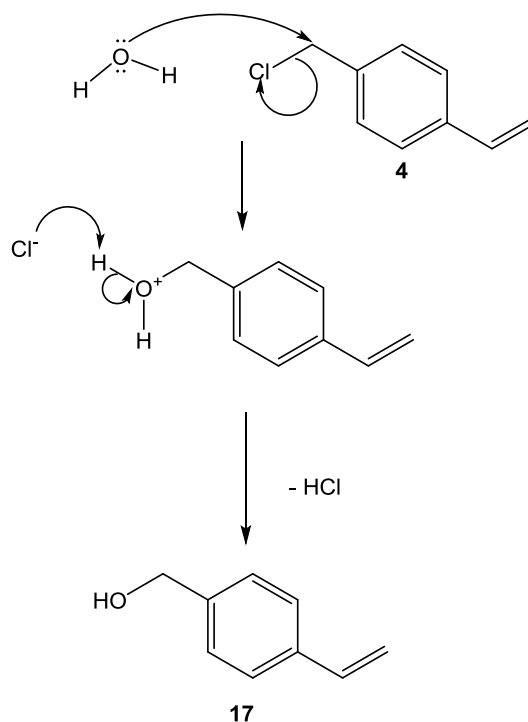
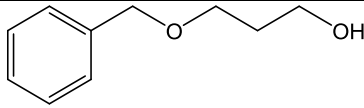
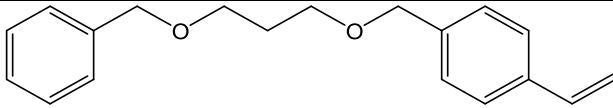


Figura 2.12: Proposta de mecanismo reaccional para a conversão do cloreto de 4-vinilbenzilo, **4** em 4-vinilbenzil metanol, **17**. Ocorre uma reacção de substituição do cloreto pelo grupo hidroxilo da água.

Para as próximas 3 reacções utilizou-se o brometo de benzilo (**18**) em vez do 4-cianofenol. Para a primeira síntese com este reagente o diol utilizado foi o 1,3-propanodiol (**19**), que foi colocado a reagir com NaH, em DMF, sob árgon e num banho de gelo durante 30 minutos. De seguida adicionou-se o composto **18**, ficando durante cinco horas num banho de óleo, à temperatura de 60°C. O controlo foi feito através de cromatografia em camada fina, com o eluente 2:1 Hex/AcOEt, tendo o produto reaccional um R_f menor do que o R_f do composto de referência (**18**). Após a purificação do produto através de uma coluna de sílica-gel, obteve-se um óleo amarelo correspondente ao 3-(benziloxi)propan-1-ol (**20**), com um rendimento de 57,9%. Seguidamente, este composto foi colocado num balão, em DMF, a reagir com NaH durante 30 minutos, num banho de gelo e sob árgon. Adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**), colocando a reacção num banho de óleo, sob refluxo, durante três horas. O controlo da reacção foi feito através de cromatografia em camada fina, eluída numa mistura de 9:1 Hex/AcOEt. Após a purificação obteve-se o produto 1-((3-(benziloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno (**21**), sob a forma de um óleo amarelo e um rendimento de 60,6%.

Comparou-se as caraterizações espectrais dos dois compostos, tendo-se verificado no espectro de ¹H RMN do composto **20** o sinal do grupo hidroxilo a 2,64 ppm, grupo também visível no espectro de IV, com a banda característica a 3390 cm⁻¹. Em relação ao composto **21**, o espectro de ¹H RMN não apresenta o sinal do grupo hidroxilo e os sinais relativos aos OCH₂ estão sobrepostos, uma vez que apresentam ambientes idênticos. Na tabela seguinte (tabela 2.5) encontram-se os resultados obtidos nos espectros de RMN e IV para ambos os compostos descritos.

Tabela 2.5: Caracterização dos compostos 3-(benziloxi)propan-1-ol, **20** e 1-(((3-(benziloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

Estrutura	 (20)	 (21)
Rendimento (%)	57,9	60,6
¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,37 - 7,26 (5H, m, CH _(Ar)) 4,50 (2H, s, C _(Ar) -CH ₂ -O) 3,74 (2H, s, CH ₂ -OH) 3,63 (2H, t, J= 5,9 Hz, O-CH ₂) 2,64 (1H, s, OH) 1,87 - 1,81 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂)	7,38 - 7,22 (9H, m, CH _(Ar)) 6,70 (1H, dd, J ₁ =17,6 Hz, J ₂ = 10,9 Hz, CH-CH ₂) 5,73 (1H, d, J= 17,6 Hz, CH=CH ₂) 5,22 (1H; d, J= 10,9 Hz, CH=CH ₂) 4,49 (4H, t, J= 9,5 Hz, C _(Ar) -CH ₂ -O) 3,59 - 3,56 (4H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂) 1,95 - 1,89 (2H, m, CH ₂ CH ₂ CH ₂)
¹³ C RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	138,1 (C _(Ar) -CH ₂) 128,5 (CH _(Ar)) 127,7 (CH _(Ar)) 73,2 (C _(Ar) -CH ₂) 69,1 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 61,5 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 32,1 (CH ₂ CH ₂ CH ₂)	138,5 (C _(Ar) -CH ₂) 138,2 (C _(Ar) -CH ₂) 136,9 (C _(Ar) -CH) 136,6 (CH=CH ₂) 128,3, 127,8, 127,6, 127,5, 126,2 (CH _(Ar)) 113,7 (CH=CH ₂) 72,9 (C _(Ar) -CH ₂ -O) 72,7 (C _(Ar) -CH ₂ -O) 67,3 (CH ₂ CH ₂ CH ₂) 30,2 (CH ₂ CH ₂ CH ₂)
IV (NaCl) ν _{máx} (cm ⁻¹)	3390,4 (OH) 2944,5- 2866,1 (CH _(Ar)) 1495,3 e 1365,5 (C=C _(Ar)); 1076,3 e 1025,8 (CH ₂ -O-CH ₂) 1076,3 e 1025,8 (CH ₂ -OH)	3030,3, 2925,0 e 2868,2 (CH _(Ar)) 1717,8, 1629,2 e 1606,5 (CH=CH ₂) 1453,7 e 1363,9 (C=C _(Ar)) 1098,3 (CH ₂ -O-CH ₂)

Na segunda síntese colocou-se 1,3-butanodiol (**12**), dissolvido em DMF, a reagir com NaH, em banho de gelo e sob árgon, durante 30 minutos. De seguida, adicionou-se o reagente **18**, deixando a reacção à temperatura ambiente durante 24 horas. O seu controlo foi realizado por cromatografia em camada fina, tendo como eluente uma solução de 1:2 Hex/AcOEt. No final da síntese fez-se a purificação do produto, 4-(benziloxi)butan-2-ol (**22**) que se apresenta sob a forma um óleo incolor, tendo um rendimento igual a 43,1%. De seguida este composto foi colocado a reagir com NaH durante 30 minutos e adicionou-se o cloreto de 4-vinilbenzilo. A reacção foi colocada sob aquecimento, a uma temperatura de 70°C, durante quatro horas e o seu controlo foi realizado por cromatografia em camada fina, num eluente de 9:1 Hex:AcOEt. Após a purificação obteve-se um óleo, com um rendimento de 39,1%, cuja a caracterização espectral corresponde à do composto pretendido, 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno (**23**).

Tal como aconteceu anteriormente, o espectro de ¹H RMN (figura 2.13 A) do composto **22** apresenta o sinal do grupo metilo desmultiplicado, que deveria ser um duplete e encontra-se na forma de duplete de dupletos. Com o espectro HMQC (figura 2.13 B) afirmou-se que os dois dupletos são relativos ao grupo metilo, visto que ambos estão ligados ao mesmo carbono, no entanto, no espectro de COSY (figura 2.13 C), um duplete sente o protão do CH, enquanto o outro duplete sente o OCH₂.

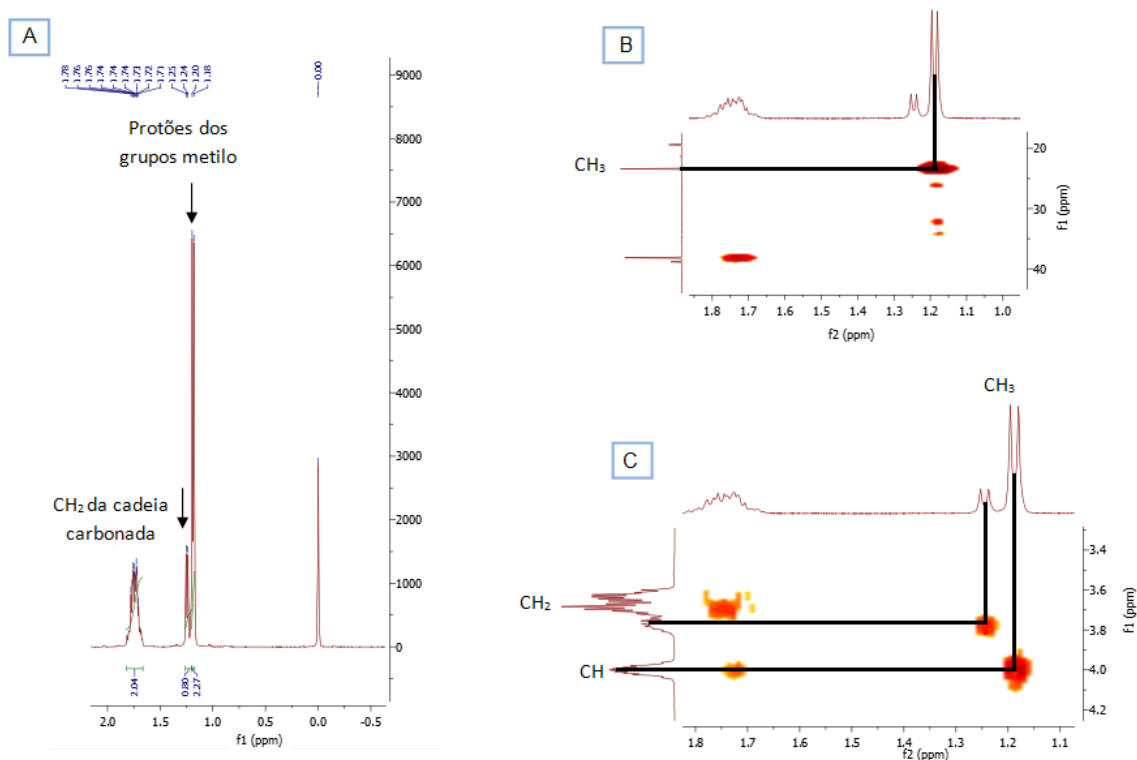
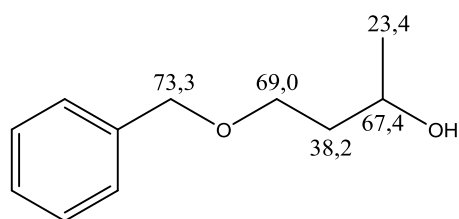
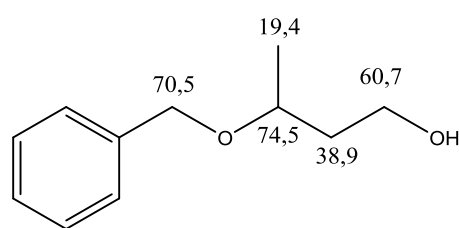


Figura 2.13: Fragmentos dos espectros de ^1H RMN (A), HMQC (B) e COSY (C) do composto 4-(benziloxy)butan-2-ol, **21**.

Novamente, quando utilizou-se o 1,3-butanodiol, não se realizou a proteção do respectivo grupo hidroxilo, podendo a base NaH desprotonar qualquer um dos grupos. Assim houve a formação do composto pretendido e de um composto minoritário, sendo possível visualizar os sinais deste composto no espectro de ^{13}C RMN, junto aos sinais relativos aos carbonos envolvidos no diol, mas com intensidades inferiores (figura 2.14).



4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**

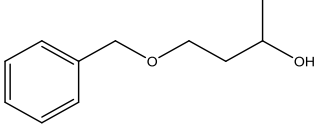
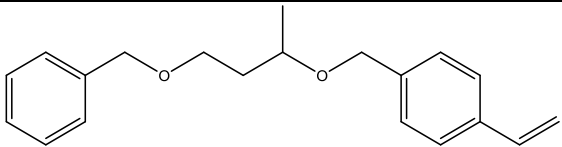


Composto minoritário, 3-(benziloxy)butan-1-ol, **23**

Figura 2.14: Estrutura química dos compostos **22** e **23** e respectivos desvios químicos no espectro de ^{13}C RMN, em ppm.

Nos espectros do composto **24** já não verificou-se esta correlação do grupo metilo, possivelmente porque o anel fornecido do cloreto de 4-vinilbenzil conferiu alguma rigidez à molécula, alterando a sua conformação. Na tabela 2.6 encontra-se a caracterização espectral dos compostos **22** e **24**.

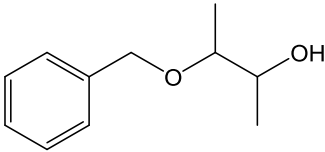
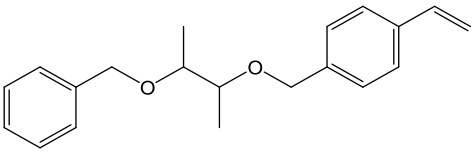
Tabela 2.6: Caracterização dos compostos 4-(benziloxi)butan-2-ol, **22** e -(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno **24**.

Estrutura	 (22)	 (24)
Rendimento (%)	43,1	39,1
¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	7,37 - 7,24 (5H, m, CH _(Ar)) 4,65 - 4,41 (2H, m, C _(Ar) -CH ₂ -O) 4,05 - 3,96 (1H, m, CH-CH ₃) 3,81 - 3,59 (2H, m, O-CH ₂) 2,97 (1H, s, OH) 1,82 - 1,66 (2H, m, CH ₂ -CH) 1,22 (3H, dd, J ₁ =22,9 Hz, J ₂ =6,2 Hz, CH ₃)	7,39 - 7,19 (9H, m, CH _(Ar)) 6,70 (1H, dd, J ₁ =17,6 Hz, J ₂ =10,9 Hz, CH=CH ₂) 5,73 (1H, dd, J ₁ = 17,6 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, CH=CH ₂) 5,26 - 5,18 (1H, m, CH=CH ₂) 4,56 (1H, dd, J ₁ = 11,7 Hz, J ₂ = 4,9 Hz, O-CH ₂) 4,48 - 4,37 (3H, m, CH ₂ -O) 3,77 - 3,67 (1H, m, CH-CH ₂) 3,65 - 3,50 (2H, m, O-CH ₂) 1,93 - 1,71 (2H, m, CH ₂ -CH) 1,21 (3H, dd, J ₁ = 6,5 Hz, J ₂ =3,9 Hz, CH ₃)
¹³ C RMN (CDCl ₃) δ (ppm)	138,0 (C _(Ar) -CH ₂) 128,5 e 127,7 (CH _(Ar)) 73,3 (CH ₂ -O) 69,0 (O-CH ₂) 67,4 (CH-CH ₃) 38,2 (CH ₂ -CH) 23,4 (CH ₃)	138,6 (C _(Ar) -CH ₂) 136,8 e 136,6 (CH=CH ₂) 128,4, 127,9, 127,7, 127,5, 126,2 e 125,5 (CH _(Ar)) 127,4 (C _(Ar) -CH) 113,9 e 113,6 (CH=CH ₂) 73,0 (CH ₂ -O) 72,7 e 72,1 (CH-CH ₃) 70,6, 70,5 e 70,3 (O-CH ₂) 67,0 e 66,9 (O-CH ₂) 37,1 (CH ₂ -CH) 19,8 (CH ₃)
IV (NaCl) ν _{máx} (cm ⁻¹)	3407,1 (OH) 2967,2 (CH _(Ar)) 2866,4 (CH) 1454,1 (CH ₂) 1373,2 (CH ₃) 1098,5 (CH ₂ -O-CH ₂)	2967,9 (CH _(Ar)) 2860,7 (CH) 1703,9 (C=C _(Vinil)) 1453,4 (CH ₂) 1374,1 (CH ₃) 1105,5 (CH ₂ -O-CH ₂)

Na última síntese adicionou-se o reagente 2,3-butanodiol (**8**), em DMF, a reagir com hidreto de sódio, durante 30 minutos, num banho de gelo e em atmosfera inerte. A reacção foi colocada num banho de óleo, a uma temperatura de 60°C e adicionou-se lentamente o brometo de benzilo (**18**). O acompanhamento reaccional foi feito por cromatografia em camada fina, tendo como mistura de solventes Hex/AcOEt, numa proporção de 1:2, onde verificou-se que a mancha do produto encontra-se abaixo da mancha do reagente **18**. Após 24 horas, realizou-se a extração e a purificação, através de coluna em sílica-gel, obtendo-se um óleo transparente, com um rendimento de 66,5%, correspondente ao 3-(benziloxi)butan-2-ol (**25**). Para o segundo passo da reacção, colocou-se este composto a reagir com hidreto de sódio, durante 30 minutos, nas mesmas condições que as anteriores. Seguidamente adicionou-se o cloreto de 4-vinilbenzilo e a reacção foi colocada a uma temperatura de 60°C. A evolução da reacção realizada por cromatografia em camada fina, com uma mistura de 9:1 de Hex/AcOEt. Depois da purificação, obteve-se um óleo amarelo, o 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno (**26**), que teve 60,1% de rendimento.

Ao analisar os espectros dos compostos **25** e **26**, verificou-se no espectro de ^1H RMN do composto **25** a presença do sinal relativo ao grupo hidroxilo, a 2,68 ppm e uma desmultiplicação do sinal relativo ao $\text{CH}_2\text{-O}$. Comparando este espectro com o espectro do composto **26**, onde o sinal do grupo hidroxilo não está presente, o sinal relativo ao $\text{CH}_2\text{-O}$ já não se encontra desmultiplicado. Também verificou-se que a adição do anel oriundo do cloreto 4-vinilbenzilo tem influência nos desvios químicos do CH, uma vez que no composto **24** estes apresentam sinais separados e distintos, mas no espectro do composto **26**, os sinais encontram-se sobrepostos. Estas alterações nos espectros podem ser explicadas através da ação que o segundo anel faz na molécula, conferindo alguma rigidez e alterando os ambientes químicos e magnéticos do sistema. Na tabela seguinte (tabela 2.7) encontram-se as caracterizações espectrais dos compostos **24** e **26**.

Tabela 2.7: Caracterização dos compostos 3-(benziloxi)butan-2-ol, **24** e 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, **26**.

Estrutura	 (24)	 (26)
Rendimento (%)	66,5	60,1
^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm)	7,34 - 7,27 (5H, m, $\text{CH}_{(\text{Aromático})}$) 4,65 (1H, d, $J = 11,5\text{Hz}$, CH_2O) 4,43 (1H, d, $J = 11,5\text{Hz}$, CH_2O) 3,61 (1H, t, $J = 6,0\text{Hz}$, CH) 3,30 (1H, t, $J = 6,0\text{Hz}$, CH) 2,68 (1H, s, OH) 1,15 (6H, dd, $J_1 = 6,2\text{Hz}$, $J_2 = 4,9\text{Hz}$, CH_3)	7,38 - 7,23 (9H, m, $\text{CH}_{(\text{Aromáticos})}$) 6,75 - 6,65 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}_2$) 5,73 (1H, d, $J = 17,6\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$) 5,23 (1H, dd, $J_1 = 10,9\text{Hz}$, $J_2 = 3,0\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$) 4,63 - 4,57 (2H, m, CH_2O) 4,57 - 4,50 (2H, m, CH_2O) 3,63 - 3,55 (2H, m, CHCH_3) 1,18 - 1,16 (6H, m, CH_3)
^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm)	138,4 ($\text{C}_{(\text{Aromático})}\text{CH}_2$) 128,5; 127,8 e 127,7 ($\text{CH}_{(\text{Aromático})}$) 80,1 (CH) 71,1 (CH_2O) 71,0 (CH) 18,5 e 15,4 (CH_3)	139,2 - 137,7 ($\text{C}_{(\text{Aromático})}$) 136,8 e 136,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$) 128,5 - 125,5 ($\text{CH}_{(\text{Aromático})}$) 113,9 e 113,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$) 77,3 - 77,2 (CH-CH_3) 71,4 - 71,1 (CH_2O) 15,0 e 14,9 (CH_3)
IV (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	3442, 3 (OH) 2975,4 ($\text{CH}_{(\text{Aromático})}$) 2874,6 (CH) 1496,8 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Aromático})}$) 1453,7 (CH_2) 1377, 8 (CH_3) 1261,9 (CH-OH) 1091,7 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}$)	2977,6 ($\text{CH}_{(\text{Aromático})}$) 2869,6 (CH) 1629,4 e 1604,7 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Vinil})}$) 1495,9 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Aromático})}$) 1452,9 (CH_2) 1378,4 (CH_3) 1108,9 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}$)

Com os compostos sintetizados procedeu-se aos testes enzimáticos para determinar a capacidade inibitória para as metaloproteínas de matriz.

2.4. Ensaio Enzimáticos

Após a síntese dos compostos avaliou-se a sua capacidade inibitória em relação às MMPs. Para isso, foram realizados ensaios enzimáticos, recorrendo ao *MMP Inhibitor Profiling Kit, Colorimetric*, adquirido na *Enzo Life Sciences*. Este *kit* é composto por um conjunto de MMPs, o substrato (Ac-PLG-[2-mercapto-4-metilpentanoil]-LG-OC₂H₅), o *buffer* (*Brij*) e, por fim, um inibidor comercial, ácido N-isobutil-N-(4-metoxifenilsulfonil)glicil-hidroxâmico (NNGH). Uma vez que o objetivo dos ensaios é verificar a eficácia de inibição e não comparar inibidores, este último componente não será utilizado, limitando assim os elevados custos envolvidos neste tipo de ensaios.

Realizaram-se dois testes enzimáticos com duas placas cada (**a**, **b**, **c** e **d**), onde as MMPs utilizadas foram a MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13, por serem as enzimas mais abundantes nos dentes. Para a realização dos testes seguiu-se o protocolo descrito no manual do próprio *kit*. Resumidamente, após a preparação das soluções de inibidor, MMP e substrato, prosseguiu-se ao preenchimento da placa de 96 poços e esta foi lida num leitor de microplacas, ao comprimento de onda de 415 nm e com incubação de 37°C, fazendo as leituras durante 30 minutos, de 1 em 1 minuto.

Antes de cada ensaio, as placas foram dimensionadas para estimar rigorosamente o consumo de cada reagente nas soluções de MMPs, inibidor e substrato. A esta quantidade foi adicionada ainda um excesso de 10-15%, garantindo assim que a quantidade de solução preparada é suficiente para a realização do teste.

Inicialmente foram preparadas soluções dos compostos sintetizados, com uma concentração de 1 mM e 0,1 mM, realizadas nas placas **a** e **b**, e com concentrações de 0,05 mM e 0,01 mM, nas placas **c** e **d**. Os inibidores foram dissolvidos numa solução aquosa com 1% DMSO e posteriormente em *buffer Brij* do *kit*, sendo este indicado para compostos pouco solúveis em soluções aquosas. Não foram testadas concentrações mais altas de inibidor, de modo a prevenir a polimerização dos compostos, no entanto, em concentrações muito baixas pode haver o risco de não se detetar efeito inibitório.

De seguida prepararam-se as soluções de MMPs e por fim a solução de substrato, conforme o descrito no manual do *kit*. Todas estas soluções devem estar conservadas no gelo até serem utilizadas e a solução de substrato deve ser a última a ser preparada e utilizada assim que possível, de modo a evitar a sua degradação.

O preenchimento das placas teve que ser otimizado uma vez que o substrato é o componente limitante. Assim, e para evitar que um teste fique incompleto, procurou-se que cada placa contivesse o máximo de poços preenchidos, entre os testes com os compostos sintetizados e os controlos. O composto **26** não foi testado devido à falta de substrato. Foram realizados três tipos de controlos:

➤ Controlo de Estabilidade do Substrato: como o próprio nome indica, este controlo tem a finalidade de verificar a estabilidade do próprio substrato, na ausência de outro reagente.

Idealmente deveria haver um duplicado em cada placa, no entanto, só as placas **a** e **b** é que apresentam esse duplicado, uma vez que para as restantes placas a quantidade de substrato não permitiu a sua realização. Findo o teste espera-se que estes poços não apresentem a sua cor amarela, uma vez que esta indica a degradação do substrato, como irá ser descrito mais à frente.

➤ Controlo de Interação Substrato-Inibidor: este controlo tem como função observar se existe algum tipo de interação química entre o composto em teste e o substrato, nomeadamente a degradação do segundo (indicada pela coloração amarela), que pode influenciar os resultados dos testes. Assim, tal como os poços correspondentes ao controlo anterior, os poços para este controlo devem apresentar valores de absorvâncias constantes e baixos, o que indica que não há a degradação do substrato e a formação da cor amarela.

➤ Controlo de atividade enzimática: por fim, o último controlo a ser realizado tem como funcionalidade verificar a atividade da enzima (controlo positivo) e comprovar se esta se encontra ativa. Uma vez que as enzimas utilizadas são sensíveis a alterações de temperatura, os ciclos de congelamento e descongelamento podem provocar a inativação destas, tendo este controlo uma importância acrescida. Contrariamente aos controlos anteriores espera-se que estes poços apresentem valores de absorvância altos, indicativos da degradação do substrato por parte da enzima, apresentando-se com uma coloração amarela intensa.

Outro aspecto importante para o preenchimento da placa é a ordem de adição dos componentes de cada poço. Primeiro adicionou-se o *buffer* (tampão), sendo seguidamente adicionado as soluções de MMPs e de inibidor. Por fim, é adicionado o substrato, o mais rapidamente, sendo que após a primeira adição iniciou-se a contagem do tempo. Na figura seguinte encontra-se esquematizado os componentes adicionados em cada tipo de poço.

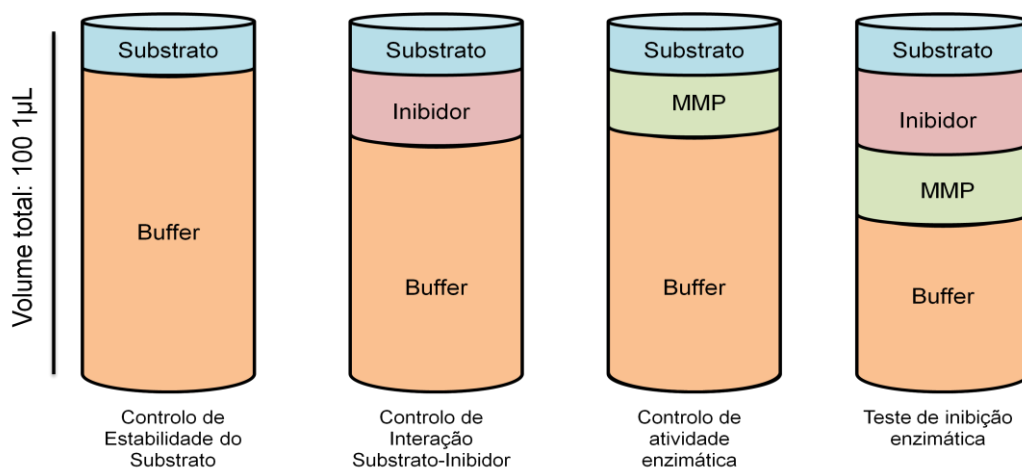


Figura 2.15: Componentes de cada tipo de poço presente nas placas.

No final do ensaio é possível visualizar os poços em que houve reacção uma vez que estes apresentam uma coloração amarela. As diferentes intensidades indicam que houve diferentes graus de degradação do substrato. O substrato, Ac-PLG-[2-mercapto-4-metilpentanoil]-LG-OC₂H₅, é um tiopéptido que sofre hidrólise por parte da enzima, formando dois produtos. Nesta reacção ocorre a substituição da ligação peptídica por uma ligação tioéster, formando-se um composto com um grupo sulfídrico (figura 2.16).

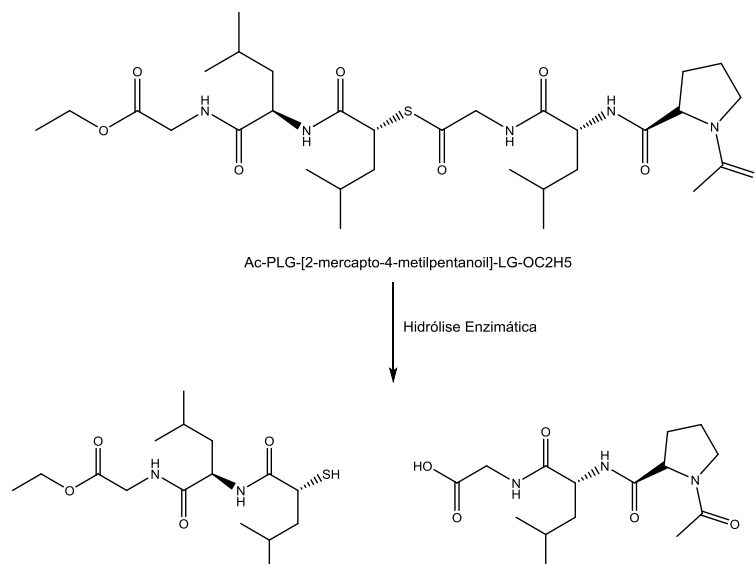


Figura 2.16: Reação de hidrólise enzimática.

Um dos constituintes do *buffer* é o reagente de *Ellman's* [5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)]. Este composto foi introduzido por Ellman em 1959, sendo também conhecido por DTNB⁸⁴. É um composto solúvel em água e tem como função quantificar os grupos sulfidrilo livres presentes numa amostra, uma vez que apresenta grande especificidade para este tipo de grupo a um pH neutro. A quantificação dos grupos sulfidrilo é feita por comparação com uma curva obtida através dos resultados fornecidos dos controlos da atividade enzimática. O DTNB reage com o grupo sulfidrilo, produzindo uma mistura de dissulfureto e o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB), sendo este último um produto corado, podendo ser quantificado a um comprimento de onda igual 415 nm (figura 2.17).⁸⁵

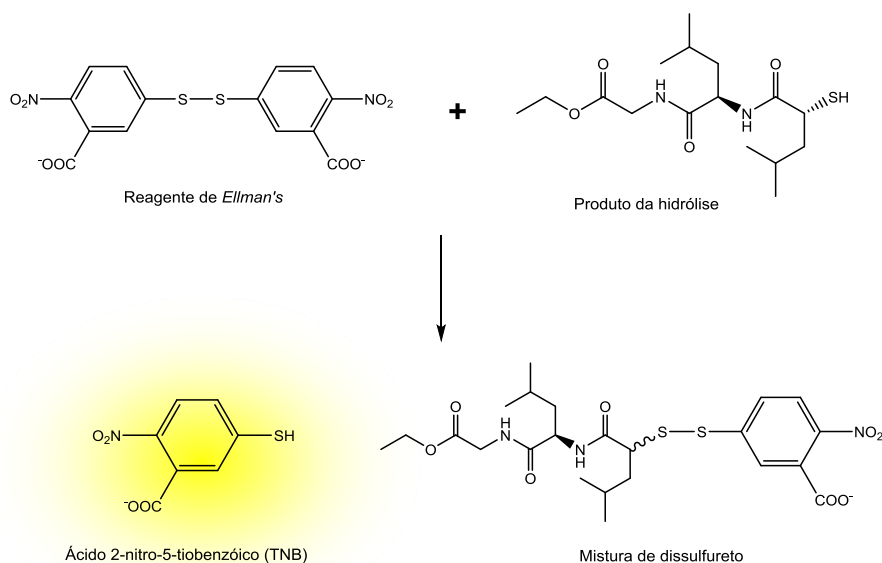


Figura 2.17: Reacção entre o reagente de *Ellman's* com o produto sulfidrilo da hidrólise enzimática. No final obtém-se uma mistura de dissulfureto e o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB), que é corado e é possível quantificá-lo através da medição da sua absorvância a um comprimento de onda de 415 nm.

As placas foram lidas a um comprimento de onda de 415 nm e incubadas a 37°C durante todo o ensaio. Após as suas leituras, traçaram-se os gráficos de densidade ótica (OD_{415nm}) em função do tempo de incubação. Para a análise dos controlos de estabilidade do substrato e da interação substrato-inibidor selecionou-se uma região com variação linear de modo a obter retas com um coeficiente de correlação linear (R^2) mais próximo que possível do valor 1.

Inicialmente analisaram-se as retas obtidas nos controlos de estabilidade do substrato (figura 2.18 e tabela 2.8), nas diversas placas, esperando-se variações lineares com um declive próximo de zero, indicando assim a inexistência da auto-degradação do substrato. Um dos duplicados realizados na placa **a** (Placa **a** (B)) apresenta valores de densidade ótica altos, juntamente com os controlos de estabilidade obtidos na placa **b** (Placa **b** (A) e Placa **b** (B)). No entanto o outro duplicado da placa **a** e os controlos presentes nas placas **c** e **d** apresentam valores de densidades óticas baixos. Esta discrepância de valores pode ser explicada por algum tipo de impureza presente nos poços, impureza essa que leva a um aumento da absorvância. Apesar dos declives obtidos, negativos para as placas **a** e **b** e positivos para as placas **c** e **d**, pode-se considerar que o substrato é estável, uma vez que estes declives e os valores de densidade ótica obtidos são muito baixos em relação aos valores presentes nos controlos de atividade enzimática e nos testes de inibição enzimática.

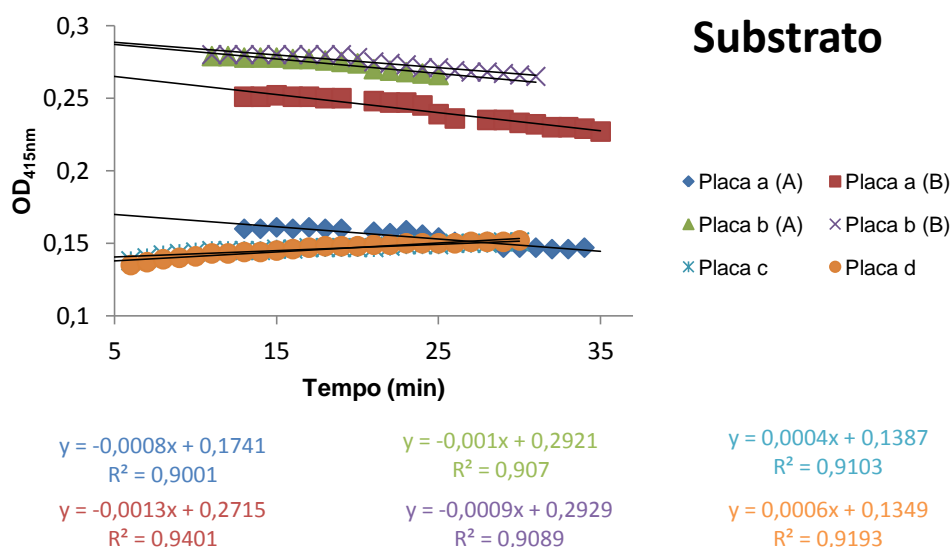


Figura 2.18: Gráfico de estabilidade do substrato ao longo do tempo.

Tabela 2.8: Parâmetros das equações das retas obtidas para os testes de estabilidade do substrato.

Reta	Declive da reta (m)	Ordenada na Origem (b)	Coeficiente de correlação linear (R^2)
Placa A (A)	-0,0008	0,1741	0,9001
Placa A (B)	-0,0013	0,2715	0,9401
Placa B (A)	-0,001	0,2921	0,907
Placa B (B)	-0,0009	0,2929	0,9089
Placa C	0,0004	0,1387	0,9103
Placa D	0,0006	0,1349	0,9193

Seguidamente foram analisadas as interações entre o substrato e os compostos sintetizados. Tal como no controlo da estabilidade do substrato, espera-se que as retas tenham declives próximos de zero, indicando assim que os compostos não reagiram com o substrato, não ocorrendo a quebra da ligação tioéster e, conseqüentemente, não se forma o grupo sulfidrílo que reagirá com o DTNB, formando o TNB, produto com coloração amarela. Para este controlo, os valores de densidade ótica obtidos variam entre os 0,19 e 0,1, valores muito baixos comparativamente com os valores atingidos nos testes de inibição enzimática e nos controlos de atividade enzimática, não influenciando os resultados fornecidos por estes. Uma vez que os declives de todas as retas são muito próximos de zero, pode-se afirmar que não existe qualquer tipo de interação entre o substrato e os compostos inibidores em teste (figuras 2.19 e 2.20).

Interação substrato-compostos (1)

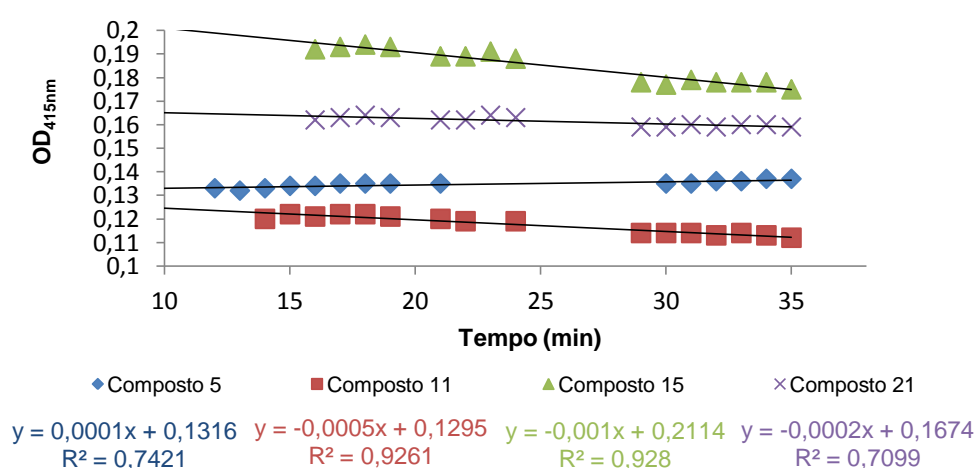


Figura 2.19: Gráfico de interação entre o substrato e os compostos 5, 11, 15 e 21.

Interação substrato-composto (2)

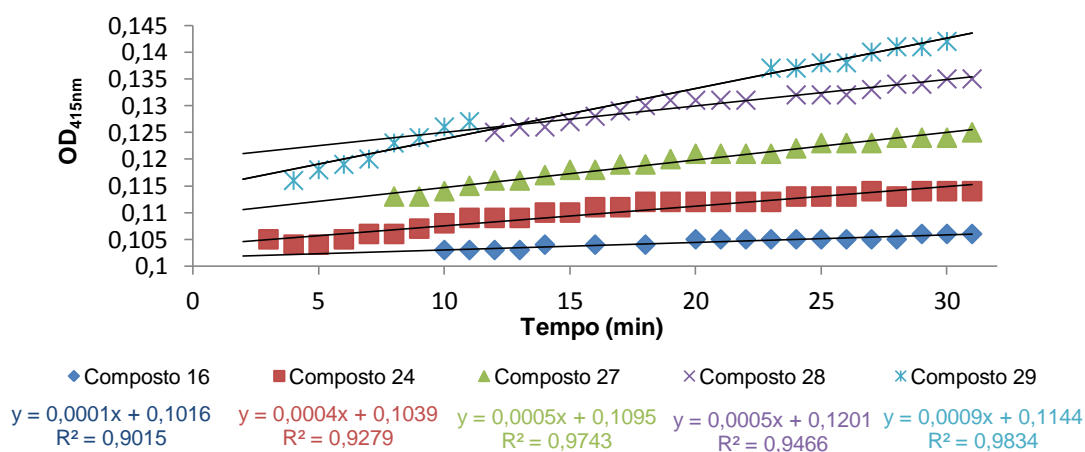


Figura 2.20: Gráfico de interação entre o substrato e os compostos 16, 24, 27, 28 e 29.

Uma reacção enzimática consiste na conversão de um substrato num produto, por parte de uma enzima. Assim, a enzima possui duas formas durante a reacção: a sua forma livre, onde se encontra disponível para reagir, e a sua forma complexada, em que possui o substrato no seu centro activo e o converte em produto. Neste caso, pretende-se inibir a enzima, isto é, que esta forme um complexo com o inibidor e não com o substrato, não havendo assim a conversão deste em produto.

À medida que a conversão do substrato ocorre, a concentração deste diminui, afetando assim a velocidade da reacção. No gráfico de densidade ótica em função do tempo de incubação, a curva apresenta inicialmente um comportamento linear e vai estabilizando ao longo do tempo, até atingir o equilíbrio. Uma forma de simplificar o estudo das reacções enzimáticas é a determinação da velocidade inicial, V_0 , onde se considera que a concentração de substrato é constante, isto é, a zona linear da curva. Será esta a abordagem utilizada para a análise dos resultados do controlo de atividade enzimática e dos testes de inibição. Assim, e conforme o explicado no manual do *kit* enzimático, foram seleccionados os 10 primeiros pontos, que se encontram na zona linear da curva e de onde é possível retirar a velocidade inicial da reacção através do declive da reta. A placa **a** foi a única em que a seleção foi até os 15 minutos, devido à ausência de leituras entre o minuto 5 e 12, devido a problemas técnicos.

Começando a análise pela atividade enzimática da MMP-1, observou-se que em todas as placas esta enzima degradou o substrato, como era esperado, entrando no equilíbrio ao fim de 20 minutos, aproximadamente. No entanto, na placa **b**, entre o minuto 23 e o minuto 28, ocorreu uma diminuição dos valores de absorvância, fenómeno já ocorrido nos testes enzimáticos anteriormente realizados por colegas. Infelizmente não foi possível atribuir uma causa para o sucedido, uma vez que, supostamente, a reacção é irreversível, ou seja, não há a formação do substrato e consequente diminuição da coloração amarela. Em todas as placas o comportamento da MMP-1 foi idêntico, obtendo-se velocidades iniciais muito próximas sendo, em média, igual a 43,9 mOD/min, sendo este o valor utilizado para os cálculos de atividade enzimática remanescente (figura 2.21).

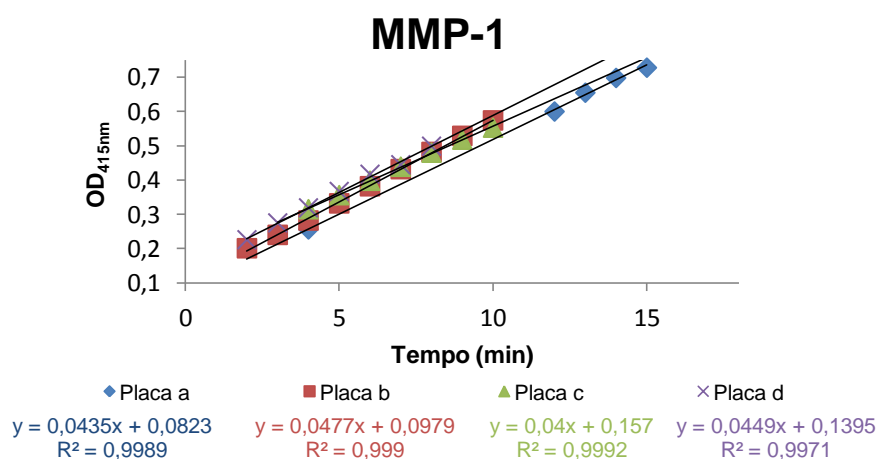


Figura 2.21: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-1 nas placas **a**, **b**, **c** e **d**.

Em relação à MMP-2, apesar de apresentar atividade, esta não é igual entre os dois testes realizados, como ocorreu com a MMP-1. Enquanto, que nas placas **a** e **b** a sua atividade não atingiu o equilíbrio, sendo que o valor mais alto de absorvância localiza-se abaixo do valor 0,3, nas placas **c** e **d**, a curva atingiu o seu equilíbrio perto do minuto 27, tendo valores de absorvância máxima muito próximos de 0,6. Estes comportamentos distintos influenciam as velocidades iniciais determinadas (figura 2.22), sendo que os controlos realizados nas placas **a** e **b** apresentam uma velocidade média inicial de 4,6 mOD/min, enquanto os controlos realizados nas placas **c** e **d** têm como velocidade média inicial 20,2 mOD/min. Como estes valores são muito divergentes, serão ambos utilizados para os cálculos da inibição, sendo que comparações necessárias serão feitas tendo em conta a velocidade da respectiva placa.

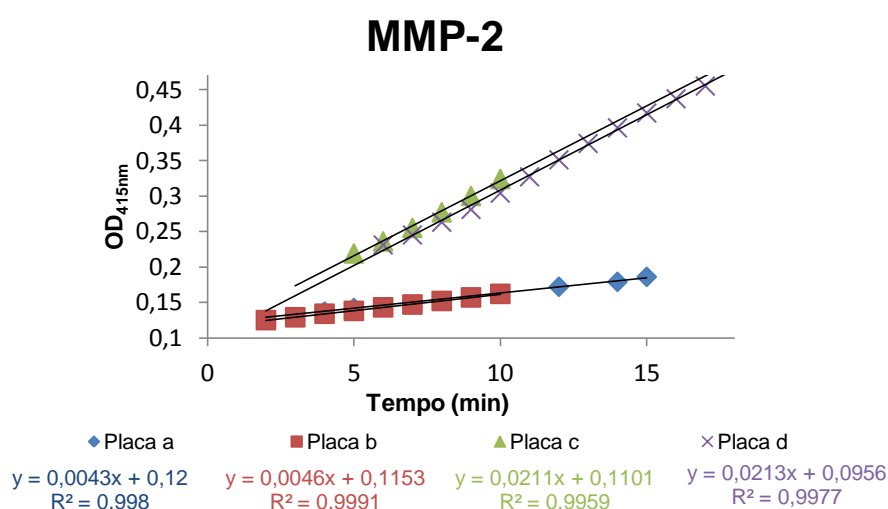


Figura 2.22: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-2 nas placas **a**, **b**, **c** e **d**.

A MMP-8 também apresentou atividade enzimática e atingiu o equilíbrio ao fim de 30 minutos nas placas **b**, **c** e **d**, com valores máximos de absorvância entre 0,5 e 0,6. Na placa **a**, após 35 minutos ainda não se verificava a estabilização da curva, havendo um aumento contínuo dos valores de absorvância, tendo como valores máximos próximos de 0,6. É possível que a presença de alguma impureza nesta placa tenha levado a este aumento dos valores de absorvância. Em relação às velocidades iniciais, contrariamente às enzimas anteriores, esta enzima apresentou velocidades diferentes em todas as placas. Assim serão utilizados todos os valores de velocidade inicial obtidos, 11,2 mOD/min, 13 mOD/min, 19,3 mOD/min e 17,3 mOD/min, para a placa **a**, **b**, **c** e **d**, respetivamente (Figura 2.23).

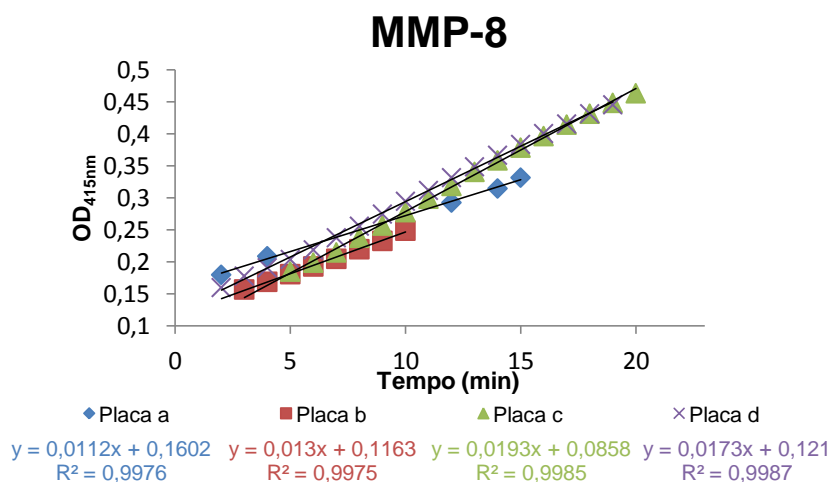


Figura 2.23: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-8 nas placas **a**, **b**, **c** e **d**.

A MMP-9 poderá ser a enzima mais sensível dos testes enzimáticos, uma vez que em estudos anteriores foi a primeira a ficar inativa, tendo um tratamento igual ao das restantes MMPs. Verificou-se que na placa **a** esta enzima não apresentou atividade enzimática, tendo valores de absorvância próximos de 0,15. Inicialmente poder-se-ia colocar a hipótese da enzima já se encontrar inativa no próprio *kit*, no entanto tal não é possível, uma vez que nos poços dos testes de inibição enzimático da própria placa verificou-se atividade e na placa **b**, realizada na mesma altura que a placa **a**, a enzima também apresentou atividade, com um declive da reta muito suave, tendo valores de absorvância entre 0,3 e 0,4. Através destas observações pode-se presumir que houve algum problema no poço da placa **a**, o que levou à inativação desta. Nas placas **c** e **d**, as retas obtidas são muito idênticas, tendo valores de absorvância máximos muito próximos de 0,3. Em nenhuma das placas se verificou o equilíbrio reaccional, sendo possível determinar três velocidades iniciais, 4,9 mOD/min utilizada como referência nas placas **a** e **b**, 8,1 mOD/min e 4,4 mOD/min, para as placas **c** e **d**, respetivamente (Figura 2.24).

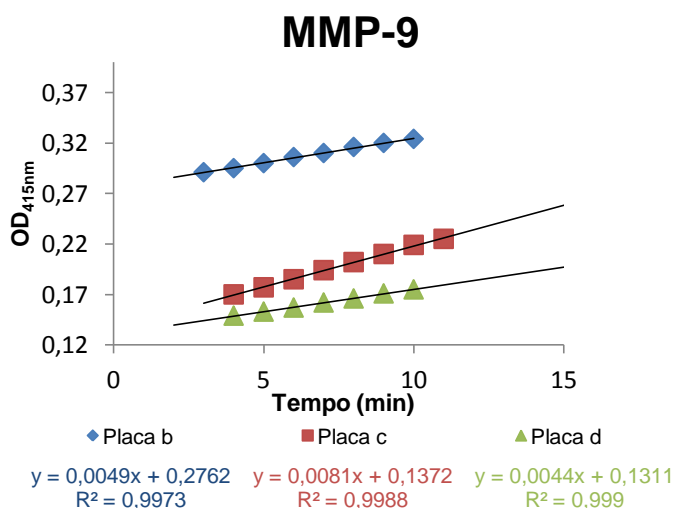


Figura 2.24: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-9 nas placas **b**, **c** e **d**.

Por fim, analisou-se a MMP-13, que demonstrou atividade enzimática em todas as placas. Nas placas **a** e **b** os valores de absorvância são muito baixos, tendo como valores máximos entre 0,4 e 0,5 e não observou-se o equilíbrio da curva. Contrariamente, nas placas **c** e **d** observou-se o equilíbrio da curva, ao fim de 10 minutos, aproximadamente. Em termos de velocidades iniciais, obteve-se uma velocidade média inicial igual a 12,8 mOD/min para as placas **a** e **b**, 99,5 mOD/min para a placa **c** e 79,1 mOD/min para a placa **d** (figura 2.25).

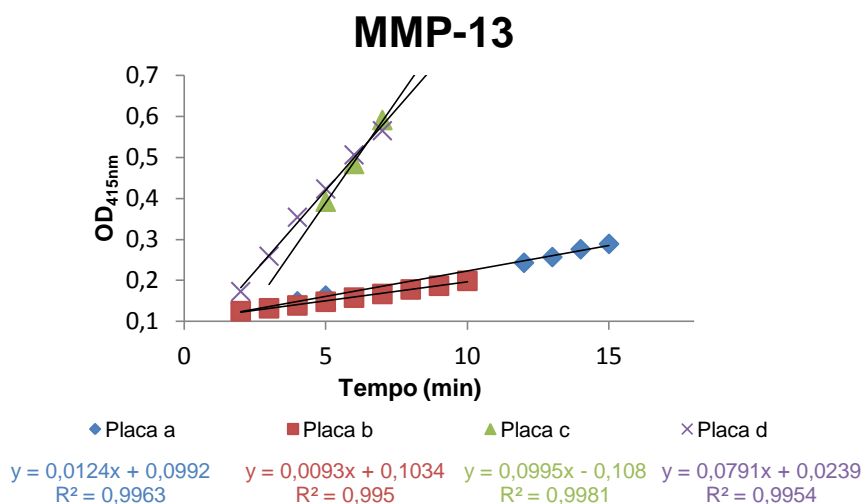


Figura 2.25: Gráfico da velocidade inicial para a MMP-13 nas placas **a**, **b**, **c** e **d**.

Segundo o manual do *kit* enzimático, as enzimas devem ser armazenadas a uma temperatura de -70°C e estas são estáveis durante algumas horas no gelo, mantendo a sua atividade máxima e estabilidade durante 5 ciclos de congelamento e descongelamento. Respeitando esta nota, as soluções do próprio *kit* só foram retiradas do congelador na altura em que iam ser utilizadas, sendo logo armazenadas quando já não eram mais necessárias. As soluções que foram aplicadas nas placas foram colocadas no gelo quando não estavam a ser utilizadas. Apesar de só ter ocorrido dois ciclos de congelamento e descongelamento, estes podem ter contribuído para a discrepância dos valores de velocidade inicial de cada enzima. De uma forma geral e tendo em consideração os gráficos apresentados anteriormente (figura 2.21 a 2.25), as placas **a** e **b** apresentam velocidades iniciais menores do que as placas **c** e **d**. Uma possível explicação para o sucedido é a forma de como as enzimas foram descongeladas. Para as placas **a** e **b** este descongelamento foi mais acelerado, recorrendo-se à agitação e aumentando o risco de danificar as próprias enzimas. Nas placas **c** e **d**, as enzimas foram deixadas no gelo, onde o descongelamento é um processo progressivo. Devido a esta discrepância, dever-se-ia repetir os ensaios tendo a mesma abordagem em todas as placas, principalmente no processo de descongelamento. Na tabela seguinte encontram-se representadas as várias velocidades iniciais determinadas para cada MMP e que serão utilizadas como referência para os estudos de inibição dentro de cada placa.

Tabela 2.9: Velocidades iniciais (mOD/min) determinadas para cada enzima e respetiva placa.

	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	MMP-13
Placa a			11,2		
Placa b		4,6	13	4,9	12,8
Placa c	43,9		19,3	8,1	99,5
Placa d		20,2	17,3	4,4	79,1

Tendo-se definido as velocidades iniciais da atividade enzimática, prosseguiu-se para a análise dos testes com os inibidores. Foram utilizadas quatro concentrações de compostos: 1 mM, 0,1 mM, 0,05 mM e 0,01 mM. Com esta variação de concentrações espera-se obter gráficos de densidade ótica em função do tempo muito semelhantes aos gráficos obtidos nos controlos de atividade enzimática. Em relação à velocidade inicial espera-se que, com a diminuição da concentração, esta se vá aproximando da velocidade de referência, de modo a obter um efeito inibitório a concentrações na gama dos nanomolar (nM), obtendo-se assim um composto com potencial farmacológico (figura 2.26, retas a roxo e laranja). No final de cada ensaio deve-se verificar a limpidez dos poços, verificando-se que houve reação enzimática ou a turbidez, indicativo da polimerização do composto (figura 2.26, reta a verde).

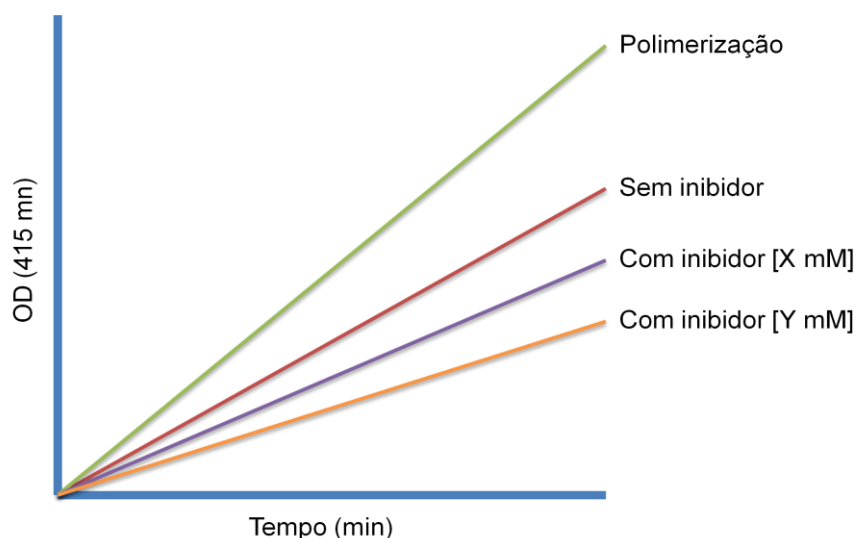


Figura 2.26: Gráfico de densidade ótica em função do tempo. O declive da reta representa a velocidade inicial. Idealmente com a diminuição da concentração de inibidor ($[X] > [Y]$), o declive da reta aumenta, ficando cada vez mais próximo do valor da velocidade da enzima na ausência do inibidor.

Traçaram-se os gráficos de densidade ótica em função do tempo de todas as MMPs na presença dos vários compostos e verificou-se que estes apresentavam um aspecto semelhante aos gráficos obtidos nos controlos de atividade enzimática. No entanto, verificou-se também que a MMP-13, na presença de 0,1 mM do composto **29** apresentou uma atividade muito elevada em relação à atividade de referência. Comparando este resultado com os obtidos nas restantes concentrações pode-se colocar a hipótese de que ocorreu a polimerização do composto na concentração de 0,1 mM ou este apresenta capacidade ativadora sobre a enzima (figura 2.27). No entanto é necessário repetir o teste com o composto **29**, de forma a retirar conclusões mais precisas.

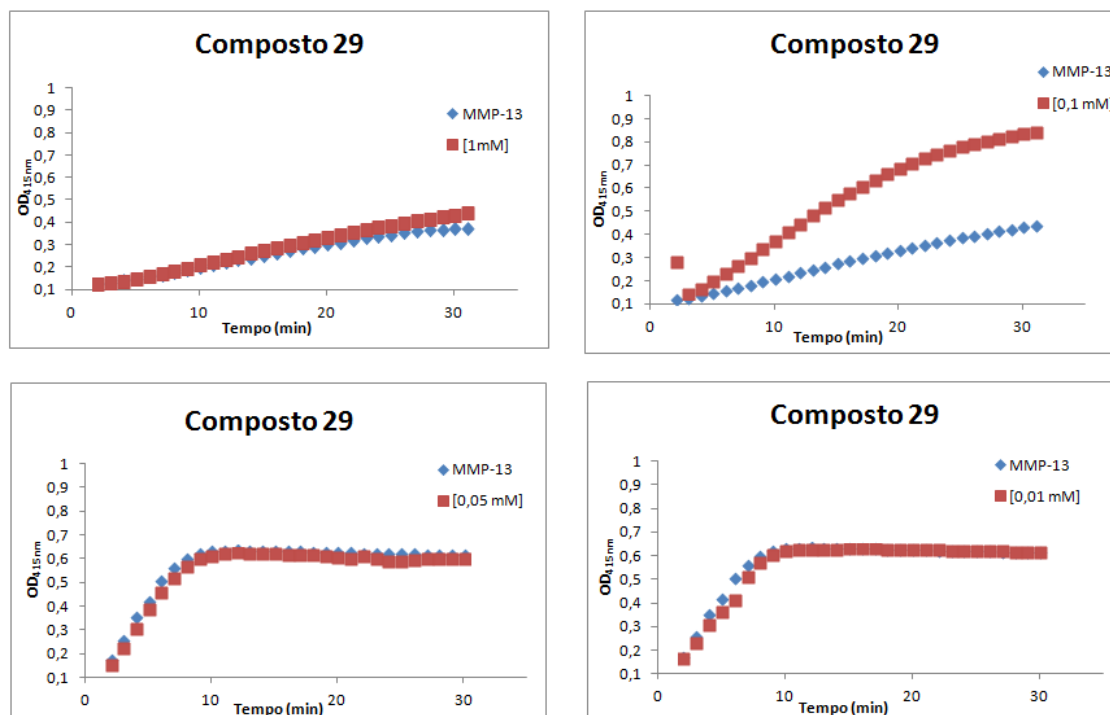


Figura 2.27: Gráficos de densidade ótica em função do tempo do composto **27** nas diversas concentrações.

Para a determinação da velocidade inicial da atividade enzimática na presença do inibidor em questão, procedeu-se da mesma forma que na determinação da velocidade inicial para os controlos das MMPs. Assim, selecionou-se um conjunto de pontos iniciais, pertencentes à zona linear do gráfico de densidade ótica em função do tempo e obteve-se as equações das retas, de onde o declive corresponde à velocidade inicial.

Através dos resultados obtidos nos testes enzimáticos com a MMP-1 verificou-se que os compostos **5**, **11**, **15** e **21** são capazes de reduzir a atividade enzimática, em todas as concentrações testadas, contrariamente ao composto **28** que apresenta valores de velocidades iniciais sempre superiores ao valor de referência. Já o composto **16** obteve um efeito inibitória nas concentrações de 1 mM e 0,01 mM enquanto os compostos **24**, **27** e **29** só foram capazes de inibir a enzima na concentração de 0,05 mM (tabela 2.10).

Tabela 2.10: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-1 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.

		Concentração			
		1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
Composto	Controlo	43,9			
	5	34,2	34,6	34,6	36,0
	11	34,1	35,7	30,8	37,1
	15	35,1	30,8	39,5	43,6
	16	41,1	44,9	44,6	43,0
	21	31,9	38,2	35,2	42,9
	24	49,6	45,9	39,7	46,3
	27	46,8	44,7	42,1	47,9
	28	46,8	46,4	46,9	50,1
	29	47,7	47,1	36,1	44,7

Para os testes de inibição com a MMP-2 foram utilizadas como referências as velocidades iniciais igual a 4,6 mOD/min, nas concentrações 1 mM e 0,1 mM, e a 20,2 mOD/min nas concentrações 0,05 mM e 0,01 mM. Verificou-se que na concentração 1 mM, o composto **15** foi o único que não teve efeito inibitório sobre a enzima e na concentração 0,01 mM só os compostos **11**, **21** e **28** é que a inibiram. Na concentração de 0,1 mM observa-se que os compostos **5**, **16**, **24** e **28** apresentaram efeitos inibitórios sobre a enzima, com valores de velocidade inicial muito próximos do valor de controlo e o composto **11** apresentou uma velocidade inicial igual ao de referência, indicando que nesta concentração não houve qualquer efeito inibitório. Por fim, na concentração 0,05 mM, os compostos **16**, **24**, **27**, **28** e **29** apresentaram valores de velocidades iniciais superiores ao valor de controlo (tabela 2.11).

Tabela 2.11: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-2 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.

		Concentração			
		1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
Composto	Controlo	4,6		20,2	
	5	4,3	4,1	14,7	21,6
	11	4,0	4,6	18,5	15,1
	15	6,3	6,0	19,5	21,6
	16	3,9	4,5	26,4	23,6
	21	4,2	5,0	19,8	17,1
	24	4,4	4,1	24,7	24,3
	27	3,5	4,7	22,0	21,9
	28	4,3	4,2	20,4	19,5
	29	4,4	5,2	22,5	21,5

Na presença dos compostos **5** e **26**, independentemente da sua concentração, a MMP-8 foi inibida. Na concentração 1 mM, os compostos **15**, **16** e **21** foram os únicos que não apresentaram efeito inibitório na enzima, mantendo este padrão na concentração 0,1 mM, com a exceção do composto **16**. Na concentração 0,05 mM, os compostos **16**, **24**, **27** e **29** foram os únicos em que as velocidades determinadas são superiores à velocidade de referência, enquanto na concentração 0,01 mM, foram os compostos **11**, **15** e **24** que apresentaram este comportamento (tabela 2.12).

Tabela 2.12: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-8 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.

		Concentração			
		1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
Composto	Controlo	11,2		19,3	
	5	10,0	10,5	14,0	14,2
	11	10,1	10,7	14,8	19,9
	15	12,7	14,9	9,2	20,8
	21	11,5	12,6	17,8	15,3
Composto	Controlo	13,0		17,3	
	16	16,5	9,5	20,6	16,9
	24	9,3	9,5	17,8	17,6
	27	9,3	11,4	18,3	16,4
	28	9,1	7,9	16,7	17,1
	29	10,0	6,0	19,0	16,2

Nos resultados obtidos nos testes com a MMP-9 verificou-se que os compostos **5**, **11**, **21**, **24** e **28** foram capazes de diminuir a velocidade inicial da enzima em todas as concentrações e o composto **15** só apresentou efeito inibitório a 0,01 mM. Nas concentrações 0,05 mM e 0,01 mM os compostos **16**, **27** e **29** foram os únicos compostos onde não verificou-se efeito inibitório (tabela 2.13).

Tabela 2.13: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-9 na presença dos vários compostos inibidores, nas várias concentrações estudadas

	Concentração			
	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
Controlo	4,9		8,1	
5	2,9	3,0	4,4	3,7
11	2,9	3,7	4,2	3,7
15	5,8	6,8	8,5	6,4
21	1,5	4,0	3,6	3,9
Controlo	4,9		4,4	
16	2,9	3,0	9,5	8,2
24	3,0	3,0	4,3	4,3
27	2,6	2,6	4,6	4,6
28	2,8	3,0	4,3	4,3
29	4,0	3,8	4,7	4,6

Por fim, a MMP-13 só sofreu inibição pelos compostos **21**, **24**, **27**, **28** e **29** na concentração de 1 mM e pelos compostos **16**, **24**, **27** e **28** na concentração de 0,1 mM. O composto **28**, na concentração igual a 0,05 mM e 0,01 mM apresentou velocidades iniciais superiores à velocidade considerada como referência, o mesmo ocorrendo no composto **29** na concentração de 0,05 mM (tabela 2.14).

Tabela 2.14: Velocidades iniciais (mOD/min) da MMP-13 na presença dos vários compostos, nas diversas concentrações estudadas.

	Concentração			
	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
Controlo	12,8		99,5	
5	14,0	15,0	59,6	50,0
11	13,4	14,8	77,0	46,5
15	19,1	16,8	68,2	59,6
21	12,4	14,3	81,0	82,4
Controlo	12,8		79,1	
16	14,5	10,2	51,9	54,6
24	9,7	9,9	58,0	48,1
27	12,0	9,2	76,5	69,6
28	10,9	9,1	79,2	81,0
29	11,6	33,4	78,2	64,3

Com a determinação das velocidades iniciais para cada MMP na presença de um composto, a uma certa concentração, já é possível concluir sobre o seu potencial inibitório, no entanto essa conclusão seria qualitativa. Assim calculou-se a percentagem de atividade da enzima na presença do inibidor, considerando que a atividade enzimática máxima corresponde a 100% da atividade, na presença do inibidor, esta percentagem baixa correspondendo à atividade enzimática remanescente e sendo a diferença entre estas duas atividades a percentagem de inibição (figura 2.28).

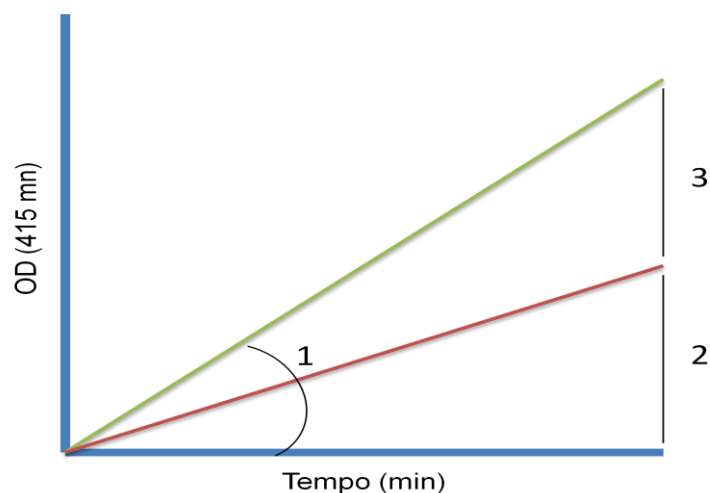


Figura 2.28: Gráfico de densidade ótica em função do tempo, para determinação das velocidades iniciais da atividade enzimática na ausência e na presença de inibidor. 1: Percentagem total da enzima sem inibidor (100%); 2: percentagem da atividade remanescente da enzima; 3: percentagem de inibição.

Para o cálculo percentual da atividade remanescente utilizou-se a seguinte formula:

$$\text{Actividade remanescente (\%)} = \frac{V_0 \text{ inibidor}}{V_0 \text{ Controlo}} \times 100$$

e recorreu-se a um gráfico de colunas para uma melhor visualização do efeito inibitório de cada composto e a variação de inibição sofrida pela diminuição da concentração.

Começando a análise pelo composto **5** verificou-se que, de um modo geral, há uma diminuição da percentagem de atividade enzimática remanescente com a diminuição da concentração do composto, sendo que as enzimas MMP-1, -8 e -9 foram inibidas em todas as concentrações de composto. A MMP-9 foi a enzima que apresentou percentagens de atividade muito baixa em todas as concentrações, atingindo 45,68% de atividade em 0,01 mM de compostos **5**. A MMP-2 na presença do 0,01 mM de composto apresentou uma atividade acima de 100% (106,93%), sucedendo-se o mesmo com a MMP-13 na presença de 1 mM e 0,1 mM de inibidor, com atividades de 109,38% e 117,19%, respetivamente (figura 2.29).

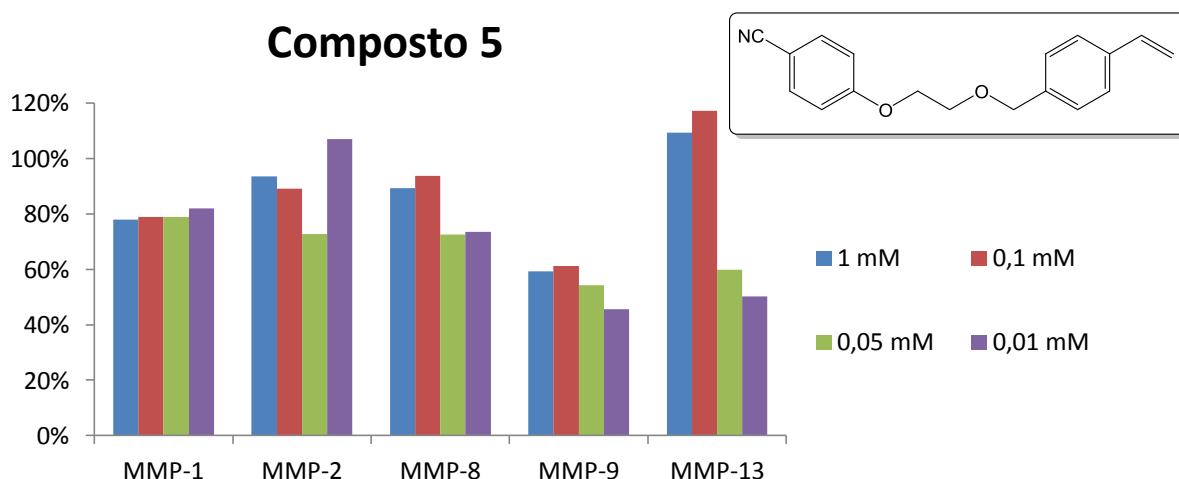


Figura 2.29: Gráfico da actividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **5**.

O composto **11** apresentou um comportamento idêntico ao composto anterior, sendo que as MMPs-1, -2 e -9 foram inibidas por este composto em todas as concentrações estudadas. Novamente a MMP-9 foi a enzima que apresentou as percentagens de atividade remanescente mais baixas, com valores compreendidos entre 75,51% e 45,68% e a MMP-2 na presença do composto em estudo na concentração de 0,1 mM obteve uma percentagem de 100%, a mesma atividade que a enzima apresentaria na ausência de inibidor. Na concentração de 0,01 mM não verificou-se efeito inibitório sobre a MMP-8 e na MMP-13 só houve inibição nas concentrações de 0,05 mM e 0,01 mM (figura 2.30).

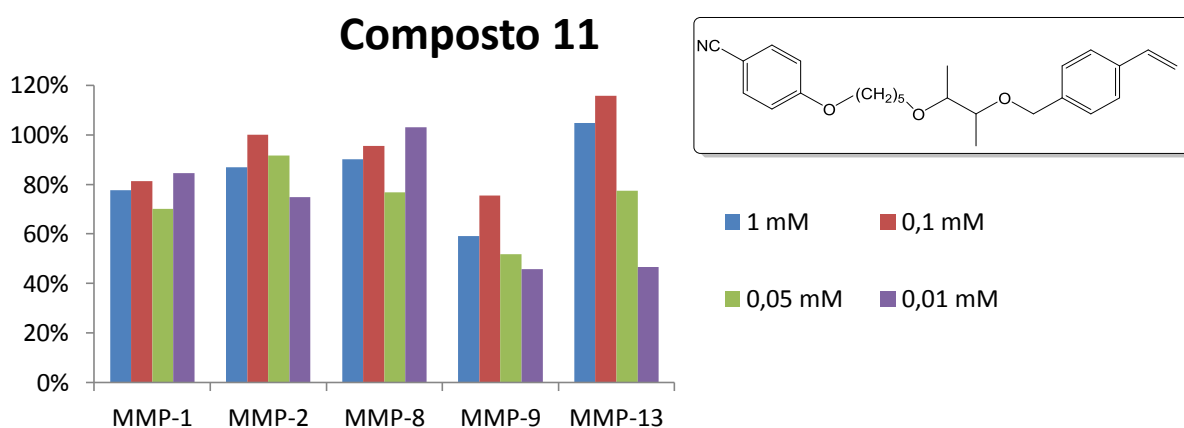


Figura 2.30: Gráfico da actividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **11**.

A enzima MMP-1 foi a única a ser inibida pelo composto **15**, em todas as concentrações estudadas, tendo valores percentuais de atividade remanescente compreendidos entre 70,16% e 99,32%. As MMPs-2 e -8 apresentaram uma atividade remanescente inferior a 100% na concentração de 0,05 mM, sendo que o valor obtido para a MMP-2 (96,53%) foi superior ao valor obtido para a MMP-8 (47,67%). Em relação à MMP-9, só se verificou efeito inibitório na concentração de 0,01 mM, com uma percentagem de atividade enzimática remanescente igual a 79,01%. Por fim, a MMP-13 foi inibida na presença de 0,05 mM e 0,01 mM de composto, com valores percentuais de atividade próximos, 68,54% e 59,90%, respetivamente (figura 2.31).

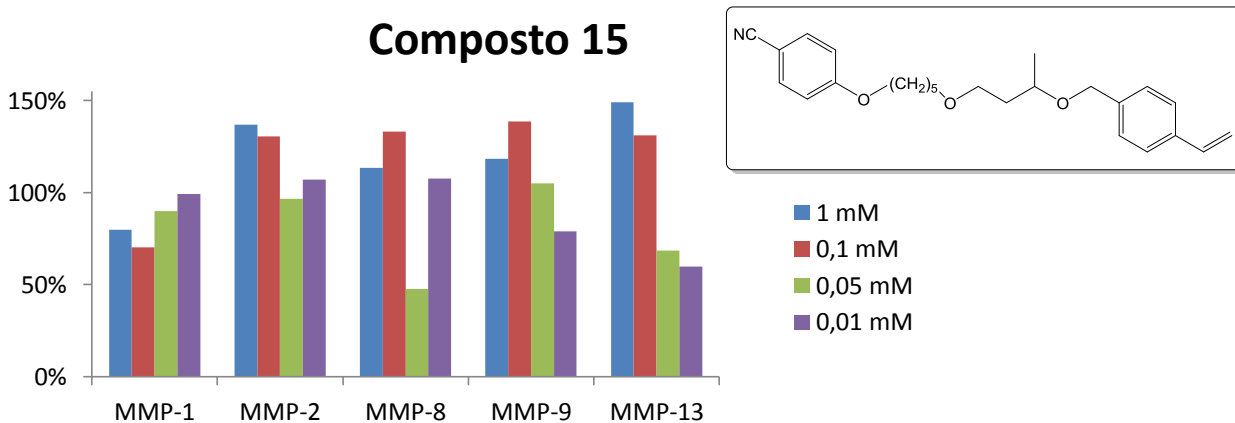


Figura 2.31: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **15**.

O composto **16** poderá ser um potencial inibidor de MMP-1 e MMP-13, apesar de ambas apresentarem atividade remanescente acima dos 100%, no entanto, verificou-se que com a diminuição da concentração do composto, a percentagem da atividade também diminui. A MMP-2 só foi inibida pelo composto **16** nas concentrações de 1 mM e 0,1 mM, sendo que nesta última concentração a atividade enzimática é de 97,83%. Na MMP-9 verificou-se um comportamento idêntico ao da MMP-2, no entanto, as percentagens de atividade remanescente foram menores e muito próximas entre si, sendo 59,18% em 1 mM e 61,22% em 0,1 mM. Também nesta enzima verificou-se uma atividade próxima de 200% nas concentrações 0,05 mM e 0,01 mM. Por último, a MMP-8 só foi inibida na presença de 0,1 mM e 0,01 mM de composto (figura 2.32).

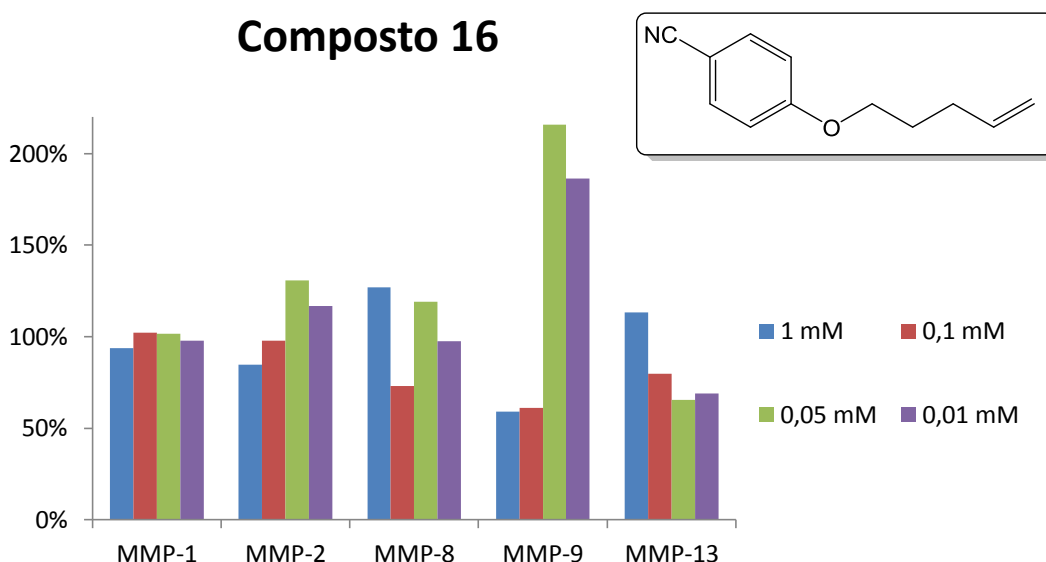


Figura 2.32: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **16**.

O composto **21** foi capaz de diminuir a atividade enzimática de todas as MMPs, uma vez que na maioria das concentrações estudadas a percentagem de atividade remanescente foi abaixo de 100%. Nas MMPs-1 e -9 verificou-se que com a diminuição da concentração, os valores percentuais de atividade aumentaram, no entanto, a MMP-9 na presença de 0,1 mM apresentou uma atividade superior às atividades apresentadas com as restantes concentrações. Em relação às MMPs-2, -8 e -13 verificou-se o comportamento inverso, ou seja, com a diminuição da concentração do composto, as atividades também foram diminuindo, sendo que a concentração 0,1 mM apresentou uma atividade acima da 100%, em todas as enzimas (figura 2.33).

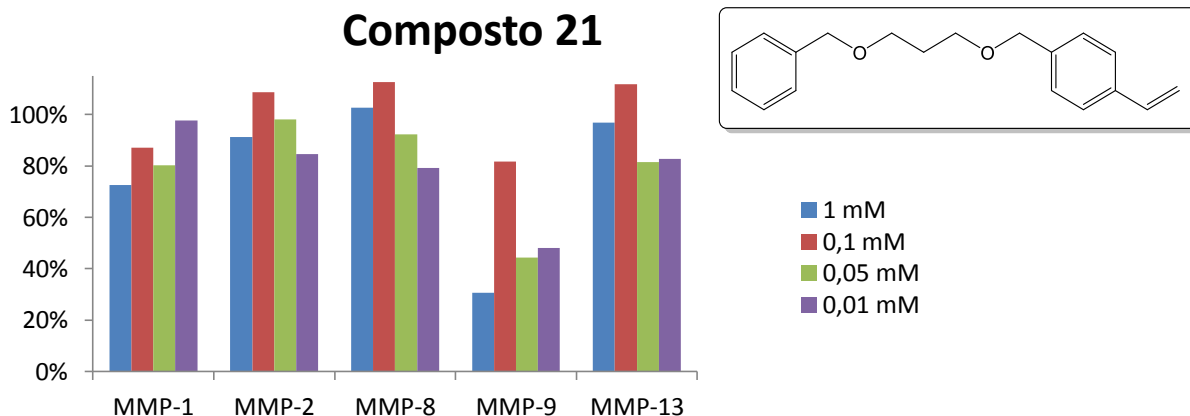


Figura 2.33: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **21**.

O composto **24** demonstrou grande efeito inibitório sobre a MMP-13, uma vez que com a diminuição da concentração utilizada deste composto, a atividade enzimática vai diminuindo. Em relação à MMP-1, esta só demonstrou atividade enzimática abaixo dos 100% quando se encontrava na presença de 0,05 mM de composto. Nas MMPs-2, -8 e -9 verificou-se um comportamento idêntico em todas elas, tendo atividades muito altas na presença de concentrações iguais a 0,05 mM e 0,01 mM de inibidores (figura 2.34).

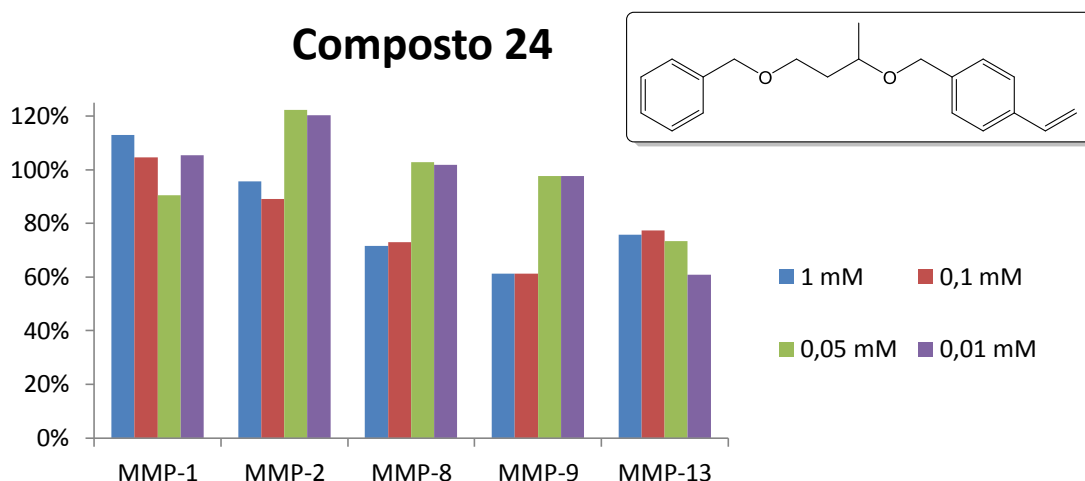


Figura 2.34: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **24**.

A MMP-1 na presença de 0,05 mM do composto **27** apresentou uma percentagem de atividade enzimática remanescente de 95,90%, sendo que nas restantes concentrações esta atividade foi sempre acima dos 100%. As MMPs-2 e -8 apresentaram um comportamento idêntico onde, com o aumento da concentração do composto estudado, ocorreu um aumento da atividade remanescente, tendo valores muito próximos de 100%. A MMP-9, na presença de 1 mM e 0,1 mM de inibidor, apresentou uma atividade igual a 56,03% e na presença de 0,05 mM e 0,01 mM esta percentagem foi de 104,55%. Por fim, a MMP-13 foi a única enzima em que o composto

apresentou efeito inibitório em todas as concentrações estudadas, no entanto, os valores de atividade obtidos estão compreendidos entre 71,88% e 96,71% (figura 2.35).

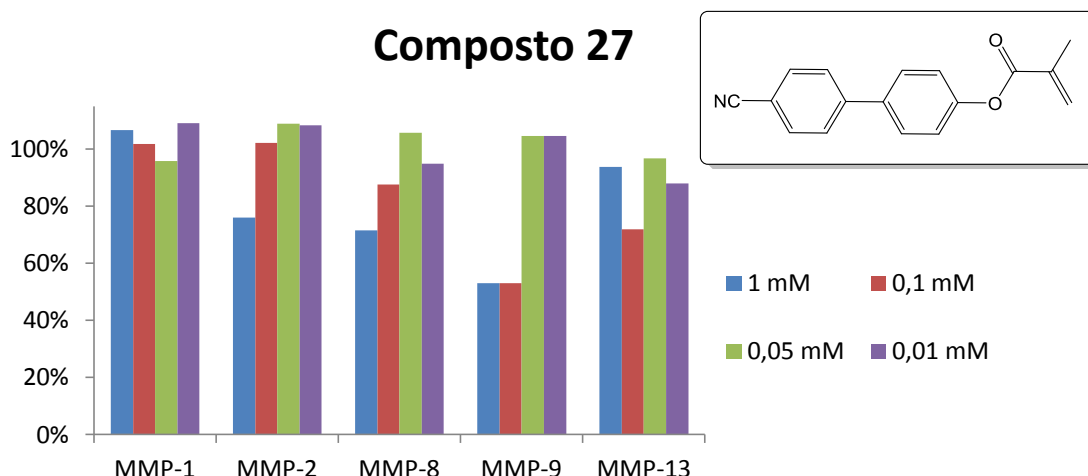


Figura 2.35: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **27**.

No composto **28** não se verificou efeito inibitório sobre a MMP-1, sendo que os valores de atividade apresentados nas diversas concentrações são muito próximos de 100%. As restantes MMPs demonstraram um comportamento idêntico entre elas, observando-se que na presença de 0,05 mM e 0,01 mM a atividade enzimática remanescente está compreendida entre 96,53% e 102,40%. Em relação às concentrações 1 mM e 0,1 mM, a MMP-9 foi a que apresentou valores de atividade menores, 57,14% e 61,92% (figura 2.36).

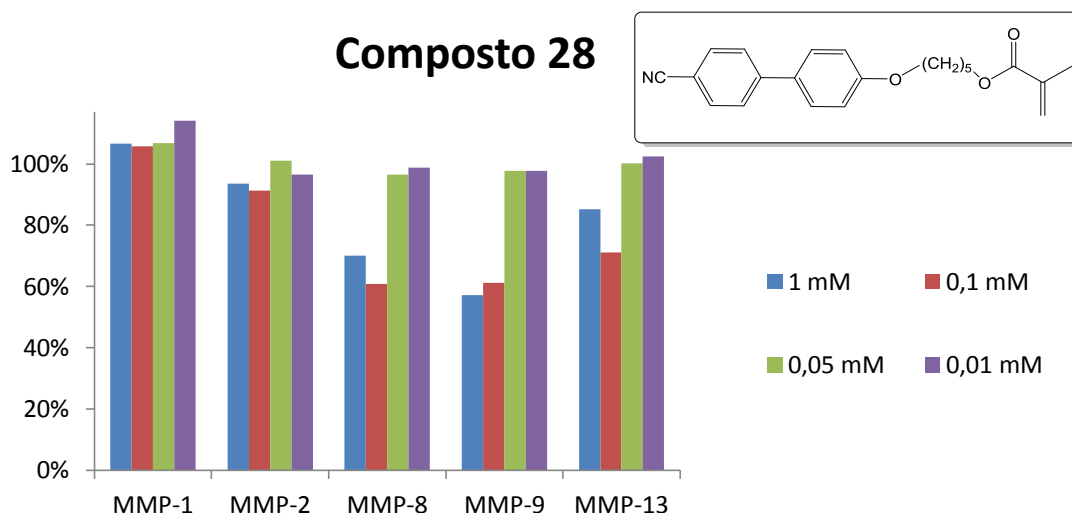


Figura 2.36: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **28**.

Por último, o composto **29** tem grande destaque na concentração 0,1 mM na MMP-13, onde se verificou um aumento abrupto da atividade enzimática, sendo a única concentração onde a percentagem de atividade é superior a 100%. Este resultado está de acordo com o resultado

obtido pelo gráfico de densidade ótica em função tempo, onde é visível uma fase estacionária na curva, podendo-se colocar a hipótese de que este composto atuou como ativador enzimático e não como inibidor. Nas restantes MMPs verificou-se valores muito próximos de 100% onde a concentração 0,05 mM de composto tem resultados superiores aos resultados obtidos com 0,01 mM. A atividade mais baixa ocorre quando a MMP-8 encontra-se na presença de 0,1 mM de composto **29** (figura 2.37).

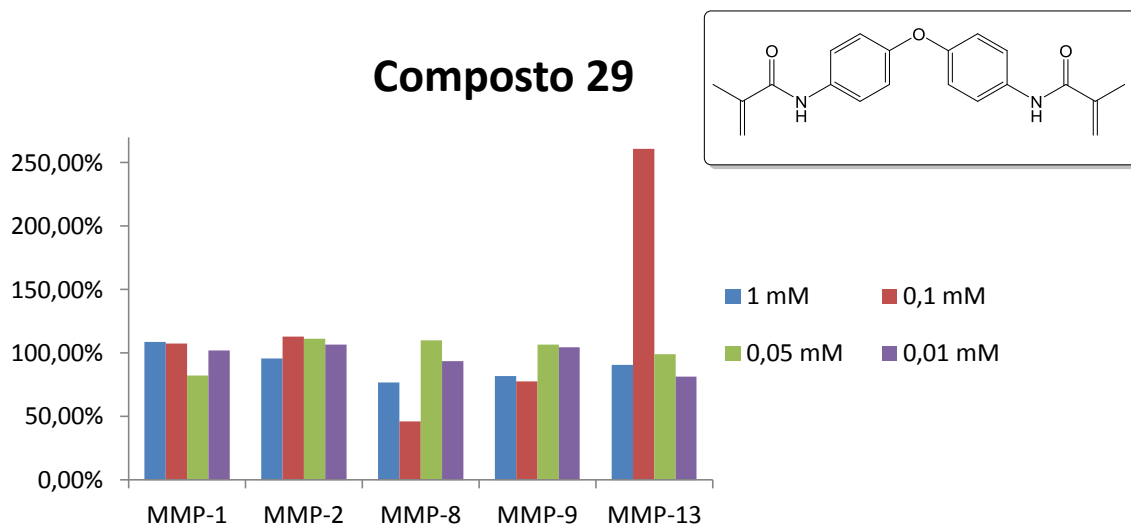


Figura 2. 37: Gráfico da atividade enzimática das cinco MMPs estudadas, na presença do composto **29**.

De uma forma geral todos os compostos demonstraram capacidade inibitória sobre as enzimas utilizadas, no entanto estes testes necessitam de ser repetidos, de modo a retirar algumas dúvidas que surgiram, nomeadamente as velocidades iniciais e a atividade remanescente superiores aos valores de referência. Uma vez que os compostos estudados são sensíveis à temperatura, e como os ensaios foram realizados com incubação (37°C), é muito provável que estes tenham sofrido um processo de polimerização, aumentando assim a densidade ótica do poço e influenciando os resultados por ele fornecidos. Também se verifica que a atividade remanescente variou de forma incerta com a diminuição da concentração do inibidor, ou seja, algumas concentrações apresentam atividades enzimáticas remanescentes acima de 100% enquanto que uma concentração intermediária demonstrou uma atividade abaixo de 100%, como é o caso da MMP-1 na presença dos compostos **24**, **27** e **29**, por exemplo.

2.5 Conclusão

Com este trabalho pretendeu-se sintetizar compostos com potencial inibitório sobre as metaloproteínas de matriz, presentes na dentina e que são responsáveis pela pouca durabilidade das restaurações dentárias.

Os compostos sintetizados são derivados de cloreto 4-vinilbenzilo, **4**. O 4-cianofenol, **1** ou o brometo de benzilo, **18**, na presença de uma base, foi colocado a reagir com um diol, obtendo-se

um composto intermediário, que por sua vez, e em condições idênticas às anteriores, reagiu com o cloreto de 4-vinilbenzilo, **4**, obtendo-se os produtos desejados com rendimentos globais entre 13,82% e 85,22%. Estes rendimentos são considerados altos, uma vez que as reações possuem dois ou três passos reacionais.

Ao longo deste trabalho foram sintetizados e caracterizados pela primeira vez 13 novos compostos: 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**; 4-((5-((3-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **9**; 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**; 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**; 4-((5-((3-hidroxiбutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**; 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**; 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, **16**; 3-(benziloxi)propan-1-ol, **20**; 1-((3-(benziloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**; 4-(benziloxi)butan-2-ol, **22**; 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **24**; 3-(benziloxi)butan-2-ol, **25** e 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **26**. Os compostos 2-(4-cianofenol)etanol, **3** e 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, **7** já se encontravam descritos na literatura.

Durante as sínteses verificaram-se alguns problemas, nomeadamente a influência de água presente na mistura reaccional, que converteu o reagente cloreto de 4-vinilbenzilo em 4-vinilfenil metanol, **17**, através da substituição do ião cloreto pelo hidroxilo. Assim, foi necessário secar bem os reagentes utilizados, principalmente os compostos **9** e **13**, que demonstraram ser hidroscópicos. Também verificou-se que o tempo reaccional entre os reagentes e a base hidreto de sódio pode originar produtos secundários, nomeadamente o 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **11** e 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, **16**. Devido à ausência de proteção dos grupos hidroxilo, verificou-se a formação de dois compostos minoritários, 4-((5-((4-hidroxiбутан-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **14** e 3-(benziloxi)butan-1-ol, **23**, mostrando que as reacções são seletivas. Estes dois compostos não foram caracterizados, só sendo possível visualizar os seus sinais no espectro de ^{13}C RMN dos compostos **15** e **24**.

Após a síntese dos compostos foi verificada a sua capacidade inibitória, realizando-se testes enzimáticos com as MMPs-1, -2, -8, -9 e -13. Para além dos compostos **5**, **11**, **15**, **16**, **21** e **22**, também foram utilizados os compostos 4'-isocianobifenil-4-il metacrilato, **27**; 5-(4-cianofenoxi)pentil metacrilato, **28** e *N,N*-(4,4'-oxibis(4,1-fenilleno))bis(2-metilacrilamida), **29**, que já encontram-se sintetizados e caracterizados, nas concentrações de 1 mM; 0,1 mM; 0,05 mM e 0,01 mM. Devido à limitação do ensaio foi necessário otimizar as placas de forma a testar o máximo de compostos no menor número de ciclos de congelamento e descongelamento, uma vez que tanto as enzimas como o substrato são sensíveis a variações de temperaturas.

De um modo geral todos os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre as enzimas, através da diminuição da velocidade inicial e da atividade enzimática remanescente, no entanto, as especificidades destes compostos é diversificada. Uma vez que não se realizou a variação da concentração do substrato, não é possível determinar os parâmetros cinéticos (K_m e $v_{m\acute{a}x}$) para as reacções enzimáticas na presença ou ausência dos compostos. Os resultados obtidos nestes testes podem estar a ser influenciados pela polimerização dos compostos, que faz aumentar a densidade ótica e, consequentemente, os valores de velocidade inicial e atividade remanescente.

Como trabalho futuro está previsto a continuação dos testes enzimáticos com estes compostos em concentrações mais baixas, com a finalidade de obter um composto com potencial farmacológico. Depois destes testes, os compostos que demonstrarem capacidade inibitória serão submetidos a testes de toxicidade em cultura de células e a testes de resistência mecânica. Por fim, os compostos que mostrarem resultados positivos nestes estudos serão submetidos a testes clínicos. Também está previsto a síntese de novos compostos, com variação na cadeia carbonada (espaçador) e os respetivos testes enzimáticos. Espera-se obter um inibidor específico para uma MMP em concreto e que atue de forma irreversível, isto é, que seja ativado pela luz e ciclice no centro activo da enzima.

Capitulo III Parte Experimental

3.1 Preâmbulo

Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos foram fornecidos pela *Sigma-Aldrich*, *Pronalab* e *Alfa Aesar*.

O solvente utilizado para a maioria das sínteses, DMF, foi seco com óxido de bário, durante 12 horas, e posteriormente destilado a pressão reduzida, segundo os procedimentos descritos na literatura.⁸⁶ O DMF destilado foi armazenado num balão contendo peneiros moleculares de 3Å previamente activados.

As reacções foram seguidas por cromatografia em camada fina, utilizando-se placas de sílica gel 60G/UV_{254nm} *Macherey-Nagel* com 0,20mm de espessura em suporte de alumínio. Após a eluição, as placas foram observadas sob a luz ultravioleta a 254nm (*Camag*). Para a purificação dos compostos por cromatografia em coluna *flash* utilizou-se sílica gel *Carlo Erba* (40-63 µm).

Os solventes foram evaporados a pressão reduzida, tendo-se recorrido a um evaporador rotativo *Büchi R-114* acoplado a um banho de água *B-480* e a bomba de vácuo *V-700* com módulo de vácuo *V-801*. Os vestígios de solventes foram eliminados utilizando-se uma bomba de vácuo da marca *Edwards*.

Para a pesagem dos compostos utilizou-se uma balança da marca *Sartorius BL210S* com quatro casas decimais e com uma precisão de $\pm 0,1$ mg.

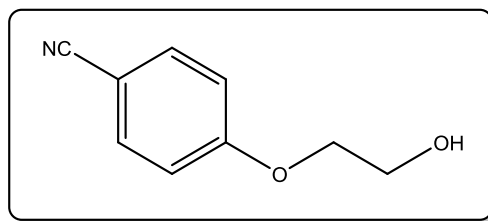
Para os compostos sólidos realizou-se a medição dos pontos de fusão através do aparelho *Electrothermal Melting Point Apparatus*.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos num espectrómetro *Bruker ARX* (400 MHz para ¹H e 101 MHz para ¹³C). Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e os dados obtidos para os espectros de protão são apresentados na seguinte ordem: solvente deuterado utilizado, desvio químico de cada sinal, intensidade relativa, multiplicidade de spin (s- singuleto; d- duplete; t- tripleto; m- multiplete; dd- duplete de duplete), constante de acoplamento (*J*, em Hz) e possível atribuição na molécula. Os dados dos espectros de carbono são apresentados na seguinte forma: solvente deuterado, desvio químico e atribuição possível na molécula em estudo. Como referência interna utilizou-se o Tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de Infra-vermelho (IV) foram traçados num espectrofotómetro *Bruker*, modelo *Tensor 27* e tratados no *software OPUS 6.0*. Efetuou-se as análises das amostras sólidas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e das amostras oleosas em pastilhas de cloreto de sódio (NaCl). Na descrição são referidas as bandas características e mais intensas de cada composto e os dados foram apresentados pela seguinte ordem: suporte da amostra, frequência do máximo da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) e, por fim, a atribuição do grupo funcional na molécula.

3.2 Síntese dos compostos

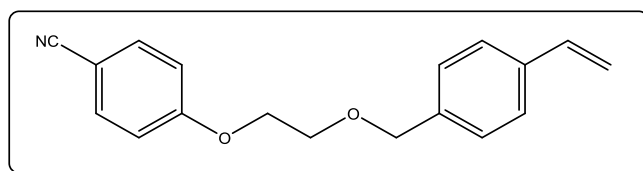
3.2.1 Síntese do 2-(4-cianofenoxi)etanol (**3**)⁸⁷



Dissolveu-se 4-cianofenol (**1**) (1,026g, 8,614 mmol) em diclorometano (20 mL). Adicionou-se 2-bromoetanol (**2**) (1,19 mL, 16,789 mmol) e K_2CO_3 (2,3755 g, 17,188 mmol) à solução, sob agitação. Colocou-se a mistura reaccional em refluxo durante 30 horas, à temperatura de 60°C. Controlou-se a reacção por cromatografia de camada fina, tendo como padrão uma amostra de 4-cianofenol (**1**) e a mistura de eluente de 1:2 Hex/AcOEt. Quando a reacção atingiu o estado de equilíbrio adicionou-se água e realizou-se a extração do produto com diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto final utilizando cromatografia de coluna em sílica e tendo um gradiente de eluentes (Hex; 1:1 Hex: AcOEt e 1:2 Hex: AcOEt).

Rendimento: 61,2% (0,859 g, 5,269 mmol); **Aspecto:** sólido branco; **Rf:** 0,50 em 1:2 Hex: AcOEt; **P.F.:** 67- 69° C; **¹H-RMN** ($CDCl_3$) δ (ppm): 7,59 (2H, d, $J=8,8$ Hz, $CH_{(Ar)}$), 6,98 (2H, d, $J=8,8$ Hz, $CH_{(Ar)}$), 4,14 (2H, t, $J=4$, CH_2-O), 4,01 (2H, t, $J=4$, CH_2-OH), 2,13 (1H, s, OH); **¹³C- RMN** ($CDCl_3$) δ (ppm): 161,9 ($C_{(Ar)}-O$), 134,1 ($CH_{(Ar)}$), 119,1 (CN), 115,3 ($CH_{(Ar)}$), 104,4 ($C_{(Ar)}-CN$), 69,6 (CH_2-O), 61,1 (CH_2-OH); **IV** (KBr, cm^{-1}): ν 3504,8 (OH); ν 2941,3 e 2848,0 ($CH_{(Ar)}$); ν 2224,9 (CN); ν 1604,0 e 1507,5 ($C=C_{(Ar)}$); ν 1463,0 (CH_2); ν 1263,7 ($O-CH_2$); ν 1040,7 (CH_2-OH).

3.2.2 Síntese do composto 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo (**5**)

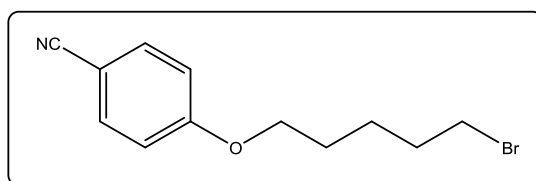


A uma solução de DMF (20 mL) adicionou-se o composto **3** (0,2599g, 5,269 mmol) com NaH (0,4261 g, 17,754 mmol) sob agitação, em banho de gelo e atmosfera de argon durante 3 horas. De seguida adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) (1,49 mL, 10,573 mmol). Deixou-se a reacção em banho de óleo, a uma temperatura de 60°C, durante 22 horas e acompanhou-se a reacção através de cromatográfica de camada fina (5:1 Hex: AcOEt), tendo como padrões o composto **3** e o reagente cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**), ambos diluídos em diclorometano. Deixou-se a mistura reaccional atingir a temperatura ambiente e procedeu-se à extracção do produto com água e diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o

excesso de solvente. Purificou-se o produto por cromatografia de coluna em sílica e eluída por gradiente (Hex; 5:1 Hex: AcOEt; 3:1 Hex: AcOEt e 1:2 Hex: AcOEt).

Rendimento: 52,4%; (0,771 g, 2,760 mmol) **Aspecto:** óleo amarelo claro; **Rf:** 0,20 em 5:1 Hex: AcOEt; **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,57 (2H, d, *J*=8,9 Hz, CH_(Ar)), 7,40 (2H, d, *J*= 8,0 Hz, CH_(Ar)), 7,31 (2H, d, *J*= 8,0 Hz, CH_(Ar)), 6,97 (2H, d, *J*= 8,8 Hz, CH_(Ar)), 6,71 (1H, dd, *J*₁= 17,6 Hz, *J*₂=10,9 Hz, CH=CH₂), 5,75 (1H, d, *J*= 17,6 Hz, CH=CH₂), 5,25 (1H, d, *J*= 10,9 Hz, CH=CH₂), 4,61 (2H, s, O-CH₂), 4,18 (2H, t, *J*= 4 Hz, O-CH₂), 3,83 (2H, t, *J*=4 Hz, CH₂-O); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 162,1 (C_(Ar)-O), 137,3 (C_(Ar)-CH₂ e C_(Ar)-CH), 136,4 (CH=CH₂), 133,9 (CH_(Ar)), 128,0 (CH_(Ar)), 126,3 (CH_(Ar)) 119,2 (CN), 115,3 (CH_(Ar)), 114,0 (CH=CH₂), 104,2 (C_(Ar)-CN), 73,2 (O-CH₂), 68,1 (CH₂-O), 67,8 (O-CH₂); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3055,2- 2986,6 (CH_(Ar)); ν 2226,9 (CN); ν 1702,8 (C=C); ν 1606,7 e 1509,0 (C=C_(Ar)); ν 1422,1 (CH₂); ν 1265,3 (O-CH₂); ν 1108,5 (CH₂-O-CH₂).

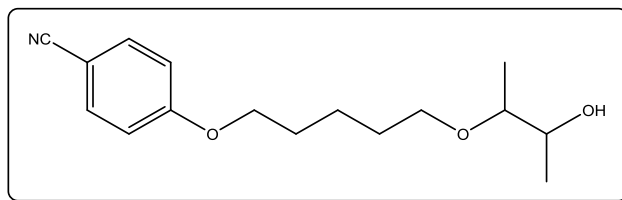
3.2.3 Síntese do 4-((5-bromopentil)oxi)benzonitrilo (**7**)⁸²



Dissolveu-se 4-cianofenol (**1**) (1,0592 g, 8,892 mmol) em acetona (20 mL). Adicionou-se à solução 1,5- dibromopentano (**6**) (2,30 mL, 16,884 mmol) e K₂CO₃ (2,3266 g, 16,834 mmol) sob agitação. Colocou-se a mistura reaccional em refluxo durante 4 horas e à temperatura de 60°C. O controlo da reacção foi feito por cromatografia de camada fina, tendo como padrão 4-cianofenol (**1**) (em diclorometano) e como mistura de eluição 9:1 Hex:AcOEt. Extraíu-se o produto adicionando água e diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto final utilizando cromatografia de coluna em sílica e tendo um gradiente de eluentes (Hex; 5:1 Hex: AcOEt e 3:1 Hex: AcOEt).

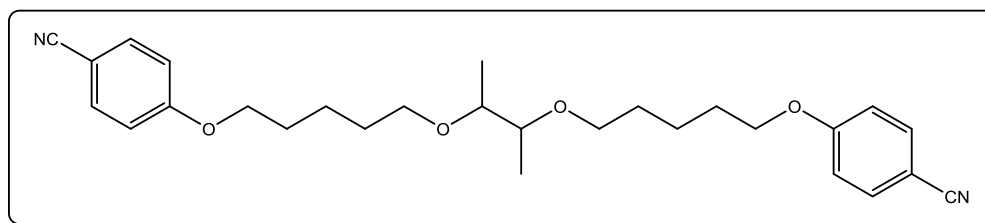
Rendimento: 74,6% (1,718g, 6,408 mmol); **Aspecto:** sólido branco; **Rf:** 0,20 em 9:1 Hex: AcOEt; **P.F.:** 57° C- 58° C; **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,58 (2H, d, *J*=8,8 Hz, CH_(Ar)), 6,93 (2H, d, *J*= 8,8 Hz, CH_(Ar)), 4,02 (2H, t, *J*= 6,3 Hz, O-CH₂), 3,44 (2H, t, *J*= 6,7 Hz, CH₂-Br), 1,96- 1,93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,86- 1,82 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,66- 1,62 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 162,3 (C_(Ar)-O), 133,9 (CH_(Ar)), 119,2 (CN), 115,2 (CH_(Ar)), 103,8 (C_(Ar)-CN), 67,9 (O-CH₂), 33,5 (CH₂-Br), 32,3 (CH₂CH₂CH₂), 28,1 (CH₂CH₂CH₂), 24,7 (CH₂CH₂CH₂); **IV** (KBr, cm⁻¹): ν 2946,1 e 2859,6 (CH_(Ar)); ν 2223,8 (CN); ν 1604,2 e 1508,9 (C=C_(Ar)); ν 1466,2 (CH₂); ν 1260,2 (C-O-CH₂); ν 1168,8, ν 635,6 e ν 548,9 (CH₂-Br).

3.2.4. Síntese do 4-((5-((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzeno (9) e do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi)) dibenzonitrile (10)



Num balão com DMF (20 mL), adicionou-se 2,3-butanodiol (**8**) (1,16 mL, 12,8 mmol) e NaH (0,5212 g, 13,03 mmol), sob árgon e num banho de gelo, durante 30 minutos. De seguida adicionou-se o composto **7** (1,7184 g, 6,408 mmol) e a reacção foi colocada sob aquecimento (60°C). O acompanhamento foi realizado por cromatografia de camada fina, tendo como mistura de solventes 1:2 Hex/AcOEt e referência o composto **7**. Ao fim de 24 horas parou-se a reacção e procedeu-se à extração com água e diclorometano. A fase orgânica foi seca, filtrada e evaporou-se o excesso de solvente para realizar a purificação por coluna de sílica gel, com um gradiente de hexano, 3:1 e 1:2 Hex/ AcOEt. Para além do composto de interesse, verificou-se a separação de mais 2 compostos secundários, o 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi)) dibenzonitrile (**10**) e o 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo (**16**).

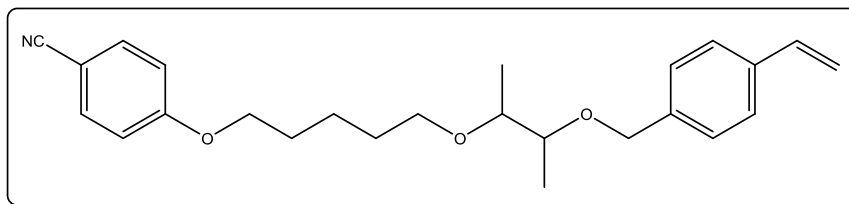
Rendimento: 56% (0,996 g, 3,589 mmol); **Aspecto:** Óleo transparente; **Rf:** 0,2 em 1:2 Hex: AcOEt; **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,57 (2H, d, *J*=8,8 Hz, CH_(Ar)); 6,93 (2H, d, *J*=8,8 Hz, CH_(Ar)); 4,01 (2H, t, *J*=6,4 Hz, O-CH₂); 3,85 (1H, dd, *J*₁=6,4 Hz, *J*₂=3,4 Hz, CH-CH₃); 3,59-3,53 (1H, m, CH₂-O); 3,47-3,41 (1H, m, CH₂-O); 3,37- 3,34 (1H, m, CH-CH₃); 2,21 (1H, s, OH); 1,87- 1,80 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1,68- 1,61 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1,58-1,54 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1,15- 1,09 (6H, m, CH₃); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 162,4 (C_(Ar)-O); 133,9 (CH_(Ar)); 119,3 (CN); 115,2 (CH_(Ar)); 103,7 (C_(Ar)-CN); 80,6 e 78,7 (CH-CH₃); 71,2 e 69,2 (CH-CH₃); 68,6 (CH₂-O); 68,2 (O-CH₂); 29,7 (CH₂CH₂CH₂); 28,8 (CH₂CH₂CH₂); 22,8 (CH₂CH₂CH₂); 18,5, 17,7, 15,4 e 13,6 (CH₃); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3454, 8 (OH); ν 2938,5 e 2871,2 (CH_(Ar)); ν 2225,3 (CN); ν 1605,8 e 1508,6 (C=C_(Ar)); ν 1472,3 (CH₂); ν 1376,7 (CH₃); ν 1260,0 (O-CH₂); ν 1172,4 e 1096,2 (CH-OH).



Rendimento: 1,9% (0,056 g, 0,121 mmol) ; **Aspecto:** Óleo amarelo; **Rf:** 0,35 em 3:1 Hex/AcOEt; **¹H RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,56 (4H, d, *J*= 8,9 Hz, CH_(Ar)), 6,92 (4H, d, *J*= 8,9 Hz, CH_(Ar)), 4,00 (4H, t, *J*= 6,4 Hz, O-CH₂), 3,58-3,52 (2H, m, CH₂-O), 3,48-3,43 (2H, m, CH₂-O), 3,42-3,37 (2H, m, CH), 1,86-1,78 (4H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,65-1,59 (4H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,57-1,50 (4H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,09 (6H, d, *J*= 6,1 Hz, CH₃); **¹³C RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 162,4 (C_(Ar)-O), 133,9 (CH_(Ar)), 119,3 (CN), 115,2 (CH_(Ar)), 103,7 (C_(Ar)-CN), 77,7 (CH-CH₃), 69,3 (CH₂-O), 68,3 (O-CH₂), 29,8 (CH₂CH₂CH₂), 28,8 (CH₂CH₂CH₂), 22,7 (CH₂CH₂CH₂), 14,9 (CH₃); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 2940,7 e

2869,3 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); ν 2225,2 (CN); ν 1606,4 e 1509,4 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Ar})}$); ν 1471,9 (CH_2); ν 1374,7 (CH_3); ν 1259,9 ($\text{C}_{(\text{Ar})}-\text{O}-\text{CH}_2$).

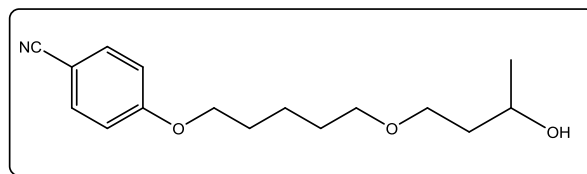
3.2.5 Síntese do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo (11)



Juntou-se o composto **9** (0,9956 g, 3,5896 mmol) com NaH (0,2934 g, 7,335 mmol) a uma solução de DMF (20 mL), num banho de gelo e sob árgon, durante 30 minutos. Seguidamente adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) (1,012 mL, 7,179 mmol) e a reacção ficou sob aquecimento (60°C) durante 24 horas. O acompanhamento foi realizado através de cromatografia de camada fina, tendo como referências o composto **4** e **9** e a mistura de solventes utilizada como eluente foi 5:1 Hex/AcOEt. Posteriormente realizou-se a extração com água e diclorometano, e a fase orgânica foi purificada por cromatografia de coluna de sílica gel, tendo como gradiente hexano, 5:1, 3:1 e 2:1 Hex/AcOEt.

Rendimento: 20,4% (0,288 g, 7,319 mmol); **Aspecto:** Óleo amarelo; **Rf:** 0,6 em 3:1 Hex: AcOEt; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3) δ (ppm): 7,55 (2H, d, $J=8,9$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 7,36 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 7,30 (2H, d, $J=8,0$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 6,90 (2H, d, $J=7,3$ Hz, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 6,73- 6,66 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,72 (1H, d, $J=17,5$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,22 (1H, d, $J=10,9$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,62-4,52 (2H, m, $\text{O}-\text{CH}_2$); 3,99- 3,94 (2H, m, $\text{O}-\text{CH}_2$); 3,55-3,51 (1H, m, $\text{CH}-\text{CH}_3$); 3,48-3,43 (2H, m, $\text{O}-\text{CH}_2$); 3,39- 3,38 (1H, m, $\text{CH}-\text{CH}_3$); 1,84- 1,78 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,63- 1,61 (2H, d, $J=6,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,57-1,52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,19- 1,10 (6H, m, CH_3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3) δ (ppm): 162,4 ($\text{C}_{(\text{Ar})}-\text{O}$); 138,6 ($\text{C}_{(\text{Ar})}-\text{CH}$); 136,8 ($\text{C}_{(\text{Ar})}-\text{CH}_2$); 136,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 133,9 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 127,8 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 126,1 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 119,3 (CN); 115, 2 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); 113,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); 103,7 ($\text{C}_{(\text{Ar})}-\text{CN}$); 78,6 e 78,0 ($\text{CH}-\text{CH}_3$); 77,7 e 77,2 ($\text{CH}-\text{CH}_3$); 71,2 e 70,8 ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_{(\text{Ar})}$); 69,3 e 69,1 (CH_2-O); 68,3 ($\text{O}-\text{CH}_2$); 29,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 28,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 22,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 15,9, 15,8, 15,1 e 15,0 (CH_3); **IV** (NaCl , cm^{-1}): ν 2937,4 e 2868,9 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$); ν 2224,3 (CN); ν 1605,7, 1572,9 e 1508,8 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Ar})}$); ν 1709,2 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); ν 1470,3 (CH_2 e CH_3); ν 1259,5 ($\text{O}-\text{CH}_2$), ν 1172,1 ($\text{CH}-\text{O}$).

3.2.6 Síntese do 4-((5-(3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (13)

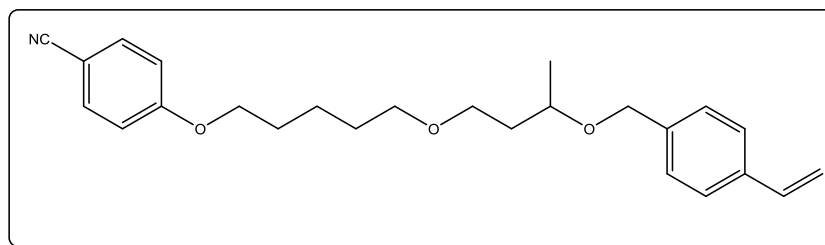


Dissolveu-se 1,3-butanodiol (**12**) (0,57 mL, 6,357 mmol) e NaH (0,262 g, 10,917 mmol) em DMF (20 mL), sob árgon e num banho de gelo e em agitação durante 3 horas. De seguida adicionou-se o composto **7** (0,85 g, 3,169 mmol) e colocou-se o balão em aquecimento, a uma

temperatura de 60°C. Controlou-se a reacção por cromatografia de camada fina, tendo como padrão o composto **7** (em diclorometano) e a mistura de eluição 1:2 Hex:AcOEt. Procedeu-se à extração do produto com uma mistura de água e diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto final utilizando cromatografia de coluna em sílica e tendo um gradiente de eluentes (Hex; 1:1 Hex: AcOEt e 1:2 Hex: AcOEt). Para além do composto pretendido, foi possível purificar o composto secundário 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo (**15**).

Rendimento: 61,4% (0,539 g, 1,946 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo claro; **Rf:** 0,56 em 1:2 Hex: AcOEt; **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,57 (2H, d, *J*=8,9 Hz, CH_(Ar)), 6,93 (2H, d, *J*= 8,9 Hz, CH_(Ar)), 3,99 (3H, q, *J*= 6,2 Hz, O-CH₂ e CH-CH₂), 3,68- 3,64 (1H, m, O-CH₂), 3,62-3,58 (1H,m, O-CH₂), 3,47 (2H, t, *J*= 6,3 Hz, CH₂-O), 2,73 (1H, s, OH), 1,87- 1,78 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,78-1,68 (2H, m, CH₂-CH), 1,68-1,61 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,58- 1;48 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,20 (3H, d, *J*= 6,2 Hz, CH₃); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 162,4 (C_(Ar)-O), 133,9 (CH_(Ar)), 119,3 (CN), 115,2 (CH_(Ar)), 103,7 (C_(Ar)-CN), 69,9 (O-CH₂), 71,1 (CH₂-O), 68,2 (O-CH₂), 67,8 (CH-CH₂), 38,0 (CH₂-CH), 29,3 (CH₂CH₂CH₂), 28,8 (CH₂CH₂CH₂), 23,3 (CH₃), 22,7 (CH₂CH₂CH₂); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3425,7 (OH); ν 2940,2 e 2867,9 (CH_(Ar)); ν 2225,1 (CN); ν 1605,6 e 1508,6 (C=C_(Ar)); ν 1471,7 (CH₂ e CH₃); ν 1260,0 (O-CH₂); ν 1172,8 (CH₂-O-CH₂); ν 1112,9 (CH₂-OH).

3.2.7 Síntese do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo (**15**)

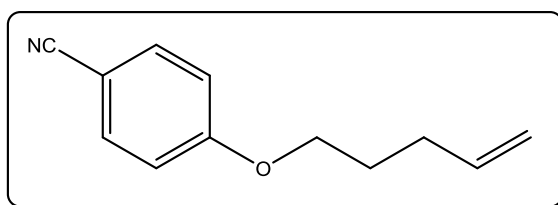


Num balão com DMF (20mL), adicionou-se composto **13** (0,5319g; 1,946 mmol) com NaH (0,2075 g; 5,186 mmol) e deixou-se em agitação, sob árgon e num banho de gelo durante 12 horas. De seguida adicionou-se cloreto 4-vinilbenzilo (**4**) (0,55mL; 3,903 mmol) e colocou-se num banho de óleo, a uma temperatura de 60°C. Controlou-se a reacção por cromatografia de camada fina, tendo como referências os reagentes **13** e cloreto 4-vinilbenzilo e fazendo-se a eluição numa mistura de 3:1 Hex:AcOEt. A extracção foi realizada com água e diclorometano e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro, sendo posteriormente filtrada e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto utilizando cromatografia em coluna de sílica e utilizou-se com gradiente de solventes as misturas de Hex:AcOEt nas seguintes proporções: Hexano; 5:1; 3:1 e 1:2.

Rendimento: 22,5% (0,169 g, 4,312 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo; **Rf:** 0,478 em 5:1 (Hex:AcOEt); **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,56 (2H, d, *J*=8,9Hz, CH_(Ar)); 7,39-7,23 (4H, m, CH_(Ar)); 6,91 (2H, d, *J*=8,8 Hz, CH_(Ar)); 6,75-6,65 (1H,m, CH=CH₂); 5,74 (1H, dd, *J*₁= 17,6 Hz, *J*₂=6,6 Hz, CH=CH₂); 5,26-5,19 (1H, m, CH=CH₂); 4,60-4,40 (2H, m, O-CH₂); 3,97 (2H, t, *J*= 6,4 Hz, O-CH₂); 3,74-3,62 (1H, m, CH-CH₃); 3,60-3,32 (4H, m, CH₂-O-CH₂); 1,84-1,78 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1,78-

1,66 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 1,65-1,55 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,55- 1,45 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,22 (2H, dd, $J_1=6,0$ Hz, $J_2=4,6$ Hz, CH_3); 1,15 (1H, dd, $J_1=6,1$ Hz, $J_2=1,6$ Hz, CH_3); ^{13}C - RMN (CDCl_3) δ (ppm): 162,6 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$); 136,9, 136,8, 136,6 e 136,5 (CH=CH_2); 133,9 (CH_{Ar}); 128,6, 128,5 e 127,8 (CH_{Ar}); 126,2, 125,5, 125,4 e 125,3 (CH_{Ar}); 119,9 (CN); 115,2 (CH_{Ar}); 113,9, 113,7 e 113,6 (CH=CH_2); 103,7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CN}$); 72,5, 72,2 e 72,1 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$); 70,7 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 70,4 e 70,2 (O-CH_2); 68,3 (O-CH_2); 67,5, 67,1 e 67,0 (O-CH_2); 37,0 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 29,8, 28,7 e 29,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 28,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 22,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 19,9 e 19,8 (CH_3); **IV** (NaCl , cm^{-1}): ν 2938,6 e 2864,9 (CH_{Ar}); ν 2224,5 (CN); ν 1509,1 (C=C_{Ar}); ν 1471,3 (CH_2); ν 1259,3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-CH}_2$); ν 1605,9 ($\text{C=C}_{\text{vinil}}$); ν 1171,9 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$); ν 1302,3 (CH_3).

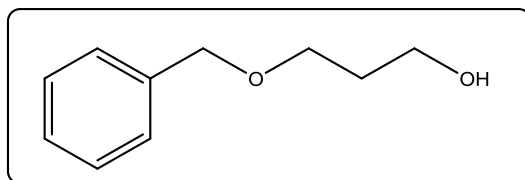
3.2.8. Síntese do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo (16)



Este composto surge como secundário nas sínteses dos compostos **9** e **13**, tendo como rendimentos 28,1% e 38,6%, respectivamente.

Aspecto: óleo amarelo; **Rf:** 0,94 em 1:2 (Hex:AcOEt); ^1H -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 7,56 (2H, d, $J=8,9$ Hz, CH_{Ar}), 6,93 (2H, d, $J=8,9$ Hz, CH_{Ar}), 5,90-5,77 (1H, m, CH=CH_2), 5,09-5,00 (2H, m, CH=CH_2), 4,01 (2H, t, $J=6,4$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2$), 2,24 (2H, q, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}$), 1,95- 1,86 (2H, m, CH_2); ^{13}C - RMN (CDCl_3) δ (ppm): 162,4 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$), 137,4 (CH=CH_2), 133,9 (CH_{Ar}), 119,3 (CN), 115,6 (CH=CH_2), 115,2 (CH_{Ar}), 103,7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CN}$), 67,5 (O-CH_2), 29,9 ($\text{CH}_2\text{-CH}$), 28,1 (CH_2); **IV** (NaCl , cm^{-1}): ν 3077,8 e 2943,7 (CH_{Ar}); ν 2224,9 (CN); ν 1641,2 e 1573,9 (C=C_{Ar}); ν 1471,7 (CH_2); ν 1259,6 (O-CH_2).

3.2.9. Síntese do 3-(benziloxi)propan-1-ol (20)

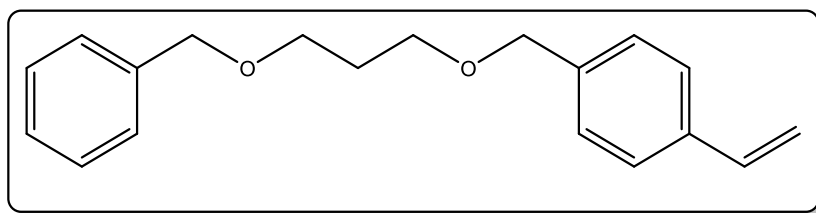


Num balão com DMF (20 mL), adicionou-se 1,3-propanodiol (**19**) (1,22 mL, 16,881 mmol e NaH (0,6877 g, 28,654 mmol) e deixou-se em agitação, sob árgon e num banho de gelo durante 30 minutos. De seguida adicionou-se brometo de benzilo (**18**) (1 mL; 8,407 mmol) e colocou-se o balão num banho de óleo, à temperatura de 60°C, durante 5 horas. Controlou-se a reacção através de cromatografia de camada fina, tendo como referência o brometo de benzilo (**18**) e como eluente uma mistura de 2:1 de Hex:AcOEt. Para a extracção utilizou-se uma mistura de água e diclorometano, sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. Na

purificação por cromatografia de coluna de sílica, utilizou-se como gradiente Hexano, 2:1 e 1:2 Hex:AcOEt.

Rendimento: 57,9% (0,808 g, 4,863 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo; **Rf:** 0,36 em 2:1 Hex:AcOEt; **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,37- 7,26 (5H, m, CH_(Ar)); 4,50 (2H, s, C_(Ar)-CH₂-O); 3,74 (2H, s, CH₂-OH); 3,63 (2H, t, *J*= 5,9 Hz, O-CH₂); 2,64 (1H, s, OH); 1,87- 1,81 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 138,1 (C_(Ar)-CH₂); 128,5 (CH_(Ar)); 127,7 (CH_(Ar)); 73,2 (C_(Ar)-CH₂); 69,1 (CH₂CH₂CH₂); 61,5 (CH₂CH₂CH₂); 32,1 (CH₂CH₂CH₂); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3390,4 (OH); ν 2944,5-2866,1 (CH_(Ar)); ν 1495,3 e 1365,5 (C=C_(Ar)); ν 1076,3 e 1025,8 (CH₂-O-CH₂ e CH₂-OH).

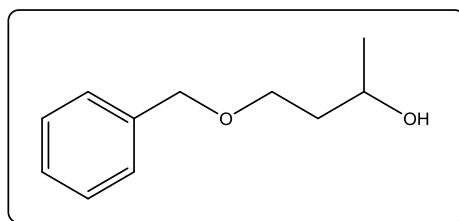
3.2.10 Síntese do 1-((3-(benziloxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno (21)



Num balão com DMF (20mL) adicionou-se o composto **20** (0,8084 g; 4,8634 mmol) e NaH (0,4037g; 16,821 mmol) e deixou-se em agitação, sob árgon e num banho de gelo durante 30 minutos. De seguida adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) (1,37 mL; 9,722 mmol) e colocou-se o balão num banho de óleo, à temperatura de 60°C, durante 3 horas. Controlou-se a reacção através de cromatografia de camada fina, tendo como referência o composto **20** e o cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) e como eluente uma mistura de 9:1 de Hex:AcOEt. Para a extracção utilizou-se uma mistura de água e diclorometano, sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. Na purificação por cromatografia de coluna de sílica, o gradiente utilizado foi hexano, 20:1, 9:1 e 1:2 Hex:AcOEt.

Rendimento: 60,6% (0,829 g, 2,938 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo; **Rf:** 0,41 em 9:1 (Hex:AcOEt); **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,38- 7,22 (9H, m, CH_(Ar)); 6,70 (1H, dd, *J*₁=17,6 Hz, *J*₂=10,9 Hz, CH-CH₂); 5,73 (1H, d, *J*= 17,6 Hz, CH=CH₂); 5,22 (1H, d, *J*= 10,9 Hz, CH=CH₂); 4,49 (4H, t, *J*= 9,5 Hz, C_(Ar)-CH₂-O); 3,59- 3,56 (4H, m, CH₂CH₂CH₂); 1,95- 1,89 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); **¹³C-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 138,5 (C_(Ar)-CH₂); 138,2 (C_(Ar)-CH₂); 136,9 (C_(Ar)-CH); 136,6 (CH=CH₂); 128,3, 127,8, 127,6, 127,5, 126,2 (CH_(Ar)); 113,7 (CH=CH₂); 72,9 (C_(Ar)-CH₂-O); 72,7 (C_(Ar)-CH₂-O); 67,3 (CH₂CH₂CH₂); 30,2 (CH₂CH₂CH₂); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3030,3, 2925,0 e 2868,2 (CH_(Ar)); ν 1717,8, 1629,2 e 1606,5 (CH=CH₂); ν 1453,7 e 1363,9 (C=C_(Ar)); ν 1098,3 (CH₂-O-CH₂).

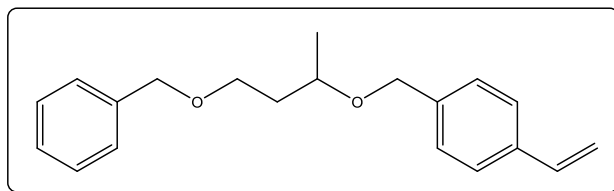
3.2.11 Síntese do 4-(benziloxi)butan-2-ol (22)



Num balão com DMF (20 mL) adicionou-se 1,3-butanodiol (**12**) (1,51 mL, 16,839 mmol) e NaH (0,6977 g, 29,071 mmol) e colocou-se o balão em agitação, sob argon e num banho de gelo, durante 30 minutos. De seguida adicionou-se brometo de benzilo (**18**) (1 mL, 8,407 mmol) e deixou-se a reacção à temperatura ambiente durante 24 horas. Controlou-se o estado da reacção por cromatografia de camada fina, tendo como referência o brometo de benzilo e como eluente uma mistura de 1:2 (Hex:AcOEt). Extraíu-se o produto com uma mistura de água e diclorometano e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, filtrou-se e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto final com uma coluna de sílica, tendo como eluentes hexano e uma mistura de Hex:AcOEt (1:1).

Rendimento: 43,09% (0,653 g, 3,623 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo claro; **Rf:** 0,656 em 1:2 (Hex:AcOEt); **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,37- 7,24 (5H, m, CH_(Ar)); 4,65- 4,41 (2H, m, C_(Ar)-CH₂-O); 4,05-3,96 (1H, m, CH-CH₃); 3,81- 3,59 (2H, m, O-CH₂); 2,97 (1H, s, OH); 1,82- 1,66 (2H, m, CH₂-CH); 1,22 (3H, dd, J₁=22,9 Hz, J₂=6,2 Hz, CH₃); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 138,0 (C_(Ar)-CH₂); 128,5 e 127,7 (CH_(Ar)); 73,3 (C_(Ar)-CH₂); 69,0 (O-CH₂); 67,4 (CH-CH₃); 38,2 (CH₂-CH); 23,4 (CH₃); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3407,1 (OH), ν 2967,2 (CH_(Ar)), ν 2866,4 (CH), ν 1454,1 (CH₂); ν 1373,2 (CH₃), ν 1098,5 (CH₂-O-CH₂).

3.2.12 Síntese do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi (24)

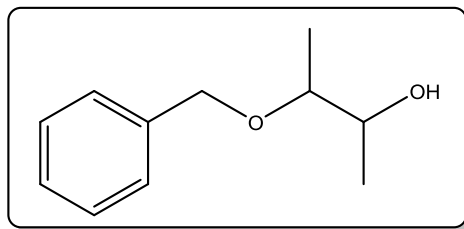


Adicionou-se o composto **22** (0,6532 g, 3,623 mmol) com NaH (0,589 g, 24,541 mmol) em DMF (20 mL), num banho de gelo, sob argon e em agitação, durante 30 minutos. De seguida adicionou-se o cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) (2,1 mL, 14,902 mmol) e colocou-se a mistura reaccional num banho de óleo, à temperatura de 70°C durante 4 horas. Controlou-se a reacção com cromatografia de camada fina, tendo como referências o composto **22** e o reagente cloreto de 4-vinilbenzil (**4**), e como eluente utilizou-se uma mistura de 9:1 (Hex:AcOEt). Realizou-se a extracção com uma mistura de água e diclorometano e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio. Seguidamente filtrou-se a solução e evaporou-se o excesso de solvente. Purificou-se o produto final com uma coluna de sílica, tendo como gradiente hexano, 20:1, 10:1 e 1:2 de uma mistura de hexano: acetato de etilo.

Rendimento: 39,12% (0,420 g, 1,417 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo; **Rf:** 0,5 em 9:1 (Hex:AcOEt); **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,39- 7,19 (9H, m, CH_(Ar)); 6,70 (1H, dd, J₁=17,6 Hz, J₂=10,9 Hz, CH=CH₂); 5,73 (1H, dd, J₁= 17,6 Hz, J₂= 5,3 Hz, CH=CH₂); 5,26- 5,18 (1H, m, CH=CH₂); 4,56 (1H, dd, J₁= 11,7 Hz, J₂= 4,9 Hz, O-CH₂); 4,48- 4,37 (3H, m, CH₂-O); 3,77- 3,67 (1H, m, CH-CH₂); 3,65- 3,50 (2H, m, O-CH₂); 1,93- 1,71 (2H, m, CH₂-CH); 1,21 (3H, dd, J₁= 6,5 Hz, J₂=3,9 Hz, CH₃); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 138,6 (C_(Ar)-CH₂); 136,8 e 136,6 (CH=CH₂); 128,4, 127,9, 127,7, 127,5, 126,2 e 125,5 (CH_(Ar)); 127,4 (C_(Ar)-CH); 113,9 e 113,6 (CH=CH₂); 73,0 (CH₂-O); 72,7 e 72,1 (CH-

CH₃); 70,6, 70,5 e 70,3 (O-CH₂); 67,0 e 66,9 (O-CH₂); 37,1 (CH₂-CH); 19,8 (CH₃); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 2967,9 (CH_(Ar)), ν 2860,7 (CH), ν 1703,9 (C=C_(vinil)), ν 1453,4 (CH₂), ν 1374,1 (CH₃), ν 1105,5 (CH₂-O-CH₂).

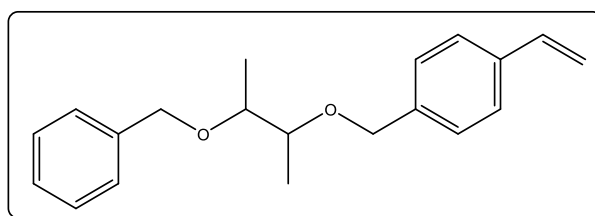
3.2.13 Síntese do 3-(benziloxi)butan-2-ol (**25**)



Num balão com DMF (20 mL) adicionou-se 2,3-butanodiol (**8**) (1,5 mL, 16,6 mmol) e NaH (0,693 g, 17,3 mmol) e deixou-se em agitação durante 30 minutos, num banho de gelo e sob árgon. De seguida adicionou-se brometo de benzilo (**18**) (1mL, 8,41 mmol) e a reacção ficou 24 horas em banho de óleo, à temperatura de 60°C. O acompanhamento foi feito por cromatografia de camada fina, onde utilizou-se uma mistura de hexano/ acetato de etilo, na proporção de 1:2 como eluente e como referência o próprio brometo de benzilo (**18**). Seguidamente realizou-se a extração do produto com água e diclorometano e à posterior purificação do produto, com o auxílio da cromatografia de coluna de sílica gel, com o gradiente de hexano, 3:1 e 1:2 Hex/AcOEt.

Rendimento: 66,5% (1,008 g, 5,588 mmol); **Aspecto:** óleo transparente; **Rf:** 0,43 em 3:1 (Hex:AcOEt); **¹H-RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 7,34- 7,27 (5H,m, CH_(Ar)); 4,65 (1H, d, J = 11,5Hz, CH₂O); 4,43 (1H, d, J = 11,5Hz, CH₂O); 3,61 (1H, t, J = 6,0Hz, CH); 3,30 (1H, t, J = 6,0Hz, CH) 2,68 (1H, s, OH); 1,15 (6H, dd, J_1 =6,2Hz, J_2 =4,9Hz, CH₃); **¹³C- RMN** (CDCl₃) δ (ppm): 138,4 (C_(Ar)CH₂); 128,5, 127,8 e 127,7 (CH_(Ar)); 80,1 (CH); 71,1 (CH₂O); 71,0 (CH); 18,5 e 15,4 (CH₃); **IV** (NaCl, cm⁻¹): ν 3442, 3 (OH), ν 2975,4 (CH_(Ar)), ν 2874,6 (CH), ν 1496,8 (C=C_(Ar)), ν 1453,7 (CH₂), ν 1377, 8 (CH₃), ν 1261,9 (CH-OH), ν 1091,7 (CH₂-O-CH).

3.2.14 Síntese do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno (**26**)



Num balão adicionou-se o composto **25** (0,9053 g, 5,022 mmol) e NaH (0,4018 g, 10,045 mmol) a uma solução de DMF (20 mL) e deixou-se a reagir durante 30 minutos, em banho de gelo e sob árgon. De seguida adicionou-se cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) (1,41mL, 10,01 mmol) e a reacção foi colocada sob aquecimento, a uma temperatura de 60°C durante 24 horas. O acompanhamento foi feito por cromatografia de camada fina, tendo o composto **25** e o cloreto de 4-vinilbenzilo (**4**) como referências e uma mistura de eluentes de 9:1 Hex/AcOEt. Posteriormente realizou-se a

extração do produto final e respetiva purificação por cromatografia de coluna de sílica gel, utilizando como gradiente hexano, 1:1 Hex/ CHCl_3 e clorofórmio.

Rendimento: 60,1% (0,895 g, 3,019 mmol); **Aspecto:** óleo amarelo; **Rf:** 0,44 em CHCl_3 ; **^1H -RMN** (CDCl_3) δ (ppm): 7,38- 7,23 (9H, m, $\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 6,75- 6,65 (1H, m, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,73 (1H, d, $J=17,6\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,23 (1H, dd, $J_1=10,9\text{Hz}$, $J_2=3,0\text{Hz}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,63- 4,57 (2H, m, CH_2O), 4,57- 4,50 (2H, m CH_2O), 3,63- 3,55 (2H, m CHCH_3), 1,17 (6H, dd, $J_1=5,7\text{Hz}$, $J_2=4,0\text{Hz}$, CH_3); **^{13}C -RMN** (CDCl_3) δ (ppm): 139,2- 137,7 ($\text{C}_{(\text{Ar})}$), 136,8 e 136,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 128,5- 125,5 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), 113,9 e 113,6 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 77,3- 77,2 ($\text{CH}-\text{CH}_3$), 71,4- 71,1 (CH_2O), 15,0 e 14,9 (CH_3); **IV** (NaCl , cm^{-1}): ν 2977,6 ($\text{CH}_{(\text{Ar})}$), ν 2869,6 (CH), ν 1629,4 e 1604,7 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{vinil})}$), ν 1495,9 ($\text{C}=\text{C}_{(\text{Ar})}$), ν 1452,9 (CH_2), ν 1378,4 (CH_3), ν 1108,9 ($\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}$).

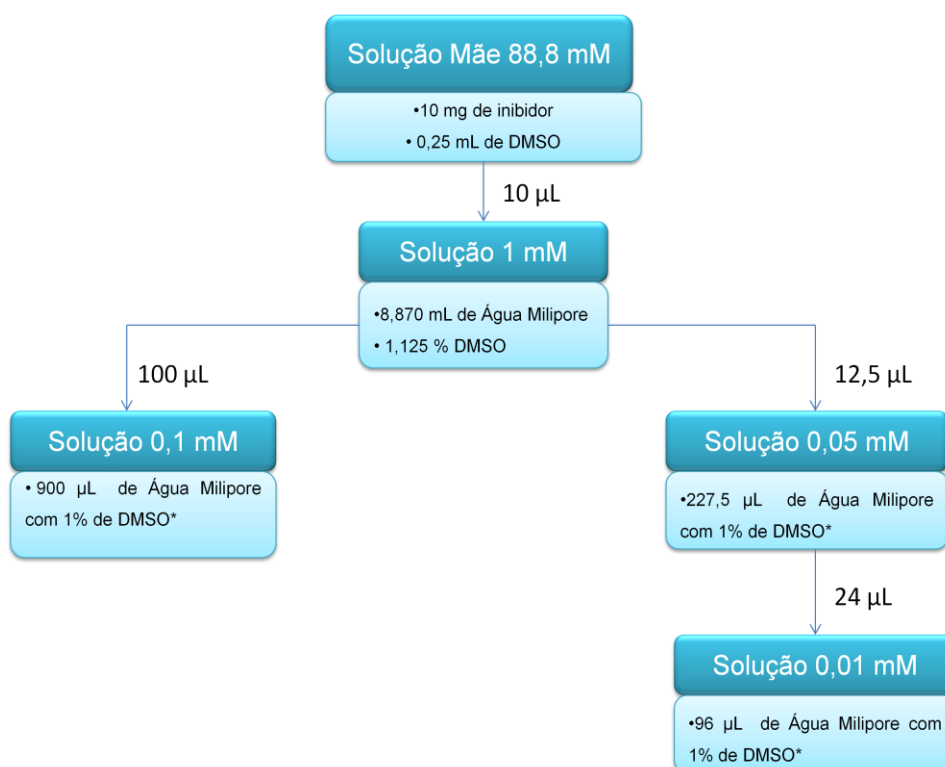
3.3. Ensaios Enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados segundo o procedimento descrito na manual do *MMP Inhibitor Profiling Kit, Colorimetric*, um kit adquirido na *Enzo Life Sciences*. Este kit é constituído por MMPs, substrato (tiopéptido), inibidor (NNGH) e buffer. O kit deve ser armazenado a -70°C e deve-se evitar os ciclos de congelamento e descongelamento desnecessários, devido à suscetibilidade de degradação do substrato e desnaturação das próprias enzimas. Durante o ensaio, tanto os tubos do kit como os *eppendorfs*, onde serão preparadas as soluções necessários, devem ser mantidas no gelo. As microplacas utilizadas foram de 96 poços e estas foram lidas no leitor de microplacas *Microplate Reader Benchmark, Bio-RAD*, no comprimento de onda de 415 nm, com uma temperatura de 37°C . O procedimento descrito a seguir é constituído por 2 partes: a preparação das soluções a serem utilizadas e o preenchimento da placa de 96 poços.

3.3.1 Preparação das soluções

Antes da preparação das soluções necessárias para os ensaios, verificou-se as micropipetas a serem utilizadas encontravam-se calibradas. Assim realizou-se a pesagem de diversos volumes de água destilada, que foram pipetados em triplicado.

Com as pipetas calibradas procedeu-se à preparação das soluções de inibidores. Para as concentrações definidas seria necessário pesar quantidades de inibidor muito pequena, tendo um erro associado elevado, por isso optou-se por fazer uma solução mãe, com 88,8 mM de concentração e a partir desta solução preparou-se as soluções com as concentrações pretendidas. A figura seguinte ilustra a forma como cada solução foi feita. (figura 3.1)



*Esta solução foi preparada previamente misturando 8,989 mL de Água Milipore com 11 µL de DMSO

Figura 3.1: Esquema do procedimento para a preparação das soluções mãe (88,8 mM), solução a 1 mM e 0,1 mM de inibidor.

De seguida preparou-se as soluções das MMPs pipetando-se os volumes descritos na tabela seguinte, seguindo os fatores de diluição recomendados no manual do *kit*. (Tabela 3.1)

Tabela 3.1: Volumes pipetados de cada MMP a ser estudada e de buffer para preparar as soluções que irão ser colocadas na placa.

MMP	Fator de diluição	Volume de MMP (µL)	Volume de Buffer (µL)
-1	40	24,15	458,85
-2	70	13,14	446,86
-8	100	9,2	450,8
-9	60	7,67	452,33
-13	50	18,4	441,6

Por fim preparou-se a solução de substrato, transferindo 49,28µL de substrato para um *epENDORF* e diluiu-se com 1,183 mL de solução *buffer*, tendo um fator de diluição de 1/25. Esta deve ser a última a ser preparada devido à fragilidade do substrato, isto é, à suscetibilidade que este tem para se degradar.

3.3.2 Preenchimento da placa

Já com todas as soluções preparadas, procedeu-se ao preenchimento da placa de 96 poços. Para rentabilizar o *kit* estudou-se a melhor forma de preencher a placa, tendo como objetivo obter o maior número de testes na mesma placa, de forma a evitar os ciclos de congelamento

referidos acima. Na figura seguinte encontra-se representada um esquema geral das placas realizadas (figura 3.2), seguida de uma tabela onde se encontra descrito a constituição de cada poço. (tabela 3.2)

Poços		A	B	C	D	E	F	G	H
1	MMP-1	Teste de inibição enzimática					Controlo da atividade enzimática		
2									
3	MMP-2						Controlo da atividade enzimática		
4									
5	MMP-8						Controlo da atividade enzimática		
6									
7	MMP-9						Controlo da atividade enzimática		
8									
9	MMP-13						Controlo da atividade enzimática		
10									
11		Controlo de interação substrato-inibidor							
12		Controlo da estabilidade do substrato							

Figura 3.2: Esquema geral da placa de 96 poços utilizada nos ensaios. Nos poços 1A- 1E até aos poços 10A- 10E realizam-se os testes de inibição enzimática. Os poços 11A- 11E realizam-se o controlo de interação substrato-inibidor. Os poços 12A e 12B estão destinados para controlo da estabilidade do substrato e por fim os poços 1F, 3F, 5F, 7F e 9F para o controlo de atividade enzimática.

Tabela 3.2: Distribuição dos poços, respetivas funções e componentes adicionados.

Poço	Função	Constituição
1A- 1E 3A- 3E 5A- 5E 7A- 7E 9A- 9E	Teste de inibição enzimática ([inibidor]= 1mM e 0,05 mM)	Buffer+ MMP-1+ Inibidor+ Substrato
2A-2E 4A- 4E 6A-6E 8A- 8E 10A- 10E	Teste de inibição enzimática ([inibidor]= 0,1 mM e 0,01 mM)	
1F 3F 5F 7F 9F	Controlo de atividade enzimática	Buffer+ MMP+ Substrato
11A- 11E	Controlo de interação substrato-inibidor	Buffer+ Inibidor+ Substrato
12A e 12B	Controlo de estabilidade do substrato	Buffer+ Substrato

A ordem de introdução das soluções na placa é importante, tendo atenção à adição do substrato, que deve ser rápida, pois este entrando em contacto com a enzima degrada-se. A ordem foi a seguinte: *Buffer*, MMP, inibidor e substrato. (figura 3.3)

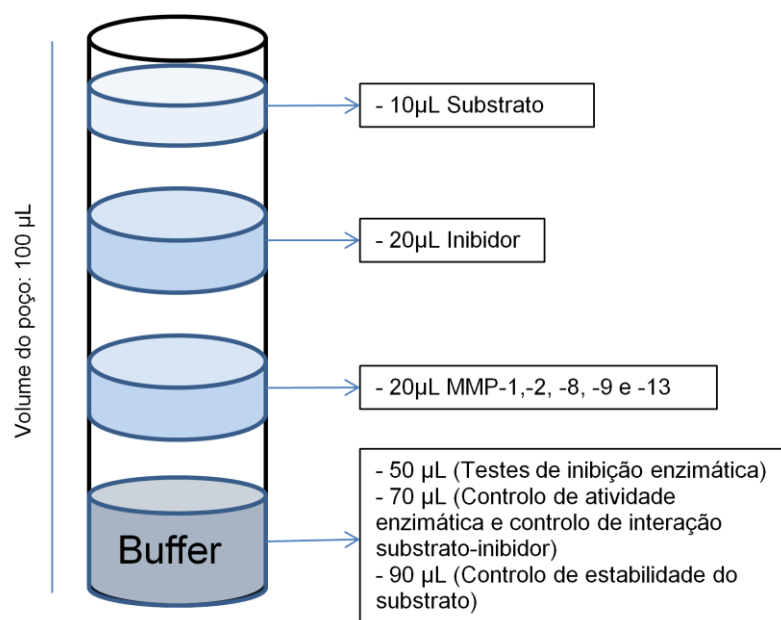


Figura 3.3: Esquema de um poço da microplaca. Inicialmente é adicionado o *buffer* (os volumes adicionados são dependentes do poço em questão). Seguidamente adiciona-se 20µL de MMP a ser estudada e 20µL de inibidor em estudo. Por fim é adicionado 10µL de substrato.

Quando o substrato foi adicionado, colocou-se a placa no leitor de microplacas, já previamente programado para incubação à temperatura de 37°C e realizou-se as leituras ao comprimento de onda de 415 nm, iniciando-se a contagem do tempo. As leituras foram realizadas de um em um minuto, num total de 30 minutos, aproximadamente.

Capitulo IV Bibliografia

1. Nelson SJ, Ash MM. *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology and Occlusion*. Missouri: Elsevier Inc.; **2010**.
2. Oliveira NA, Diniz LSM, Svizero NDR, D'Alpino PHP, Pegoraro CACC. *Dental Adhesives: new concepts and clinical applications*. Revista Dentística **2010**; 9: 6-14.
3. Zoran R. Vulicević, Ivana Davitkov, Dejan Marković, Todorović A. *Adhesive Dentistry: Future From The Past*; II Congress of BaSS. Belgrade.
4. Manjunatha BS. *Textbook of Dental Anatomy and Oral Physiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers; **2013**.
5. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A et al. *Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives*. Biomaterials **2007**; 28: 3757-3785.
6. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. *Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins*. Biomaterials **2002**; 23: 1819-1829.
7. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. *State of the art of self-etch adhesives*. Dental Materials **2011**; 27: 17-28.
8. Hashimoto M, Fujita S, Endo K, Ohno H. *Effect of dentinal water on bonding of self-etching adhesives*. Dent Mater J **2009**; 28: 634-641.
9. Pashley DH, Agee KA, Wataha JC, Rueggeberg F, Ceballos L, Ito K et al. *Viscoelastic properties of demineralized dentin matrix*. Dent mater **2003**; 19: 700-706.
10. Sezinando A. *Looking for the ideal adhesive- A review*. Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac **2014**; 55: 194-206.
11. De Munk J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M et al. *A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results*. J. Dent. Res **2005**; 2: 118-132.
12. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. *Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials*. Dental Materials **2005**; 21: 864-881.
13. Nakabayahi N, Kojima K, Masuhara E. *The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates*. J. Biomed. Mater. Res. **1982**; 16: 1240-1243.
14. Sano H, Yoshikama T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J et al. *Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo*. J Dent Res **1999**; 78: 906-911.
15. Sabatini C, Patel SK. *Matrix metalloproteinase inhibitory properties of benzalkonium chloride stabilizes adhesive interfaces*. Eur J Oral Sci **2013**; 121: 610-616.
16. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, De Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L et al. *In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine*. J Dent Res **2007**; 86: 529-533.
17. Yoonis E, Kukletová M. *SEM study on dentin/resin interface on primary teeth*. Int. Poster J. Dent. Oral Med. **2009**; 11.
18. Van Meerbeek B, Vargas S, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P et al. *Adhesives and cements to promote preservation dentistry*. Oper. Dent. **2001**; 26: 119-144.

19. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayami Y, Okazaki M, Shintani H et al. *Comparative study on adhesive performance of functional monomers*. J Dent Res **2004**; 83: 454-458.
20. Jokstad A, Bayne S, Blunck U, Tyas M, Wilson N. *Quality of dental restorations. FDI Commission Projects 2-95*. Int Dent J **2001**; 51: 117-158.
21. Liu Y, Tjäderhane L, Bresch L, Mazzoni A, Li N, Mao J et al. *Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation*. J Dent Res **2011**; 90: 953-968.
22. Almahdy A, Koller G, Sauro S, Bartsch JW, Sherriff M, Watson TF et al. *Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives*. J Dent Res **2012**; 91: 605-611.
23. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. *In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy*. Biomaterials **2003**; 24: 3795-3803.
24. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. *The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries*. J Dent Res **2006**; 85: 22-32.
25. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. *The role of matrix metalloproteinases in the oral environment*. Acta Odontol Scand **2007**; 65: 1-13.
26. Shoulders MD, Raines RT. *Collagen Structure and Stability*. Annu. Rev. Biochem **2009**; 78: 929-958.
27. Szpak P. *Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis*. Journal of Archaeological Science **2011**; 38: 3358-3372.
28. Astbury WT, Bell FO. *The molecular structure of the fibers of the collagen group*. Nature **1940**; 145: 421-422.
29. Pauling L, Corey RB. *The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group*. Proc. Natl. Acad. Sci. **1951**; 37: 273-281.
30. Ramachandran GN, Kartha G. *Structure of collagen*. Nature **1954**; 174: 269-270.
31. Rich A, Crick FHC. *The structure of collagen*. Nature **1955**; 176: 915-916.
32. Rich A, Crick FHC. *The molecular structure of collagen*. J. Mol. Biol. **1961**; 3: 483-506.
33. Sekhon BS. *Matrix metalloproteinases – an overview*. Research and Reports in Biology **2010**; 1: 1-20.
34. Henn S, De Carvalho R, Ogliari F, De Souza A, Line S, Da Silva A et al. *Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation*. Clinical Oral Investigations **2012**; 16: 531-536.
35. Hidalgo M, Eckhardt SG. *Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy*. J Natl Cancer Inst **2001**; 93: 178-193.
36. Visse R, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry*. Circ Res **2003**; 92: 827-839.
37. Lühns A, De Munck J, Geurtsen W, Van Meerbeek B. *Does inhibition of proteolytic activity improve adhesive luting?* European Journal of Oral Sciences **2013**; 121: 121-131.
38. Kukacka J, Prusa R, Kotaska K, Pelouch V. *Matrix metalloproteinases and their function in myocardium*. Biomed Papers **2005**; 149: 225-236.

39. Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. *Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development*. FEBS Letters **2004**; 563: 129-134.
40. Dormán G, Cseh S, Hajdu I, Barna L, Kónya D, Kupai K et al. *Matrix Metalloproteinase Inhibitors A Critical Appraisal of Design Principles and Proposed Therapeutic Utility*. Drugs **2010**; 70: 949-964
41. Butler GS, Tam EM, Overall CM. *The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily*. The Journal of Biological Chemistry **2004**; 279: 15615-156120.
42. Klein T, Bischoff R. *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases*. Amino Acids **2011**; 41: 271-290.
43. Hickel R, Manhart J. *Longevity of restorations in posterior teeth and reasons for failure*. J Adhes Dent **2001**; 3: 45-64.
44. Oberholzer A, Bumann M, Hege T, Russo S, Baumann U. *Metzincin's canonical methionine is responsible for the structural integrity of the zinc-binding site*. Biol Chem **2009**; 390: 875-881.
45. Gupta SP. *Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*. Springer Science & Business Media; **2012**.
46. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth F.X. *Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains*. Biochimica et Biophysica Acta **2010**; 1803: 20-28.
47. Mysliwiec AG, Ornstein DL. *Matrix metalloproteinases in colorectal cancer*. Clinical Colorectal Cancer **2002**; 1: 208-219.
48. Souza Freitas V, Ferreira de Araújo CR, Alves PM, De Souza LB, Galvão HC, De Almeida Freitas R. *Immunohistochemical expression of matrilysins (MMP-7 and MMP-26) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics **2009**; 108: 417-424.
49. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. *Biology of metalloproteinases*. Romanian Journal of Morphology and Embryology **2007**; 48: 323-334.
50. Shapiro SD. *Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences*. Curr Opin Cell Biol **1998**; 10: 602-608.
51. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. *Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin*. J Endod **2006**; 32: 862-868.
52. Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. *The molecular players of sperm-egg fusion in mammals*. Sem Cell Dev Biol **2006**; 17: 254-263.
53. Geiger SB, Harper E. *The inhibition of human gingival collagenase by an inhibitor extracted from human teeth*. J Periodontal Res **1981**; 16: 8-12.
54. Stamenkovic I. *Extracellular remodeling: the role of metalloendopeptidases*. J Pathol **2003**; 200: 448-464.

55. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. *The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions*. J Dent Res **1998**; 77: 1622-1629.
56. Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. *Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine*. Aust Dent J **2009**; 54: 347-354.
57. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. *The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine*. Arch Oral Biol **2000**; 45: 757-765.
58. Birkedal-Hansen H. *Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases*. J Periodontol **1993**; 64: 474-484.
59. Bode W, Fernandez-Catalan C, Nagase H, Maskos K. *Endoproteinase-protein inhibitor interactions*. APMIS **1999**; 107: 3-10.
60. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinases: a tale of a frog that became a prince*. Nat Rev Mol Cell Biol **2002**; 3: 207-214.
61. Whittaker M, Floyd CD, Brown P, Gearing AJ. *Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors*. Chem Rev **1999**; 99: 2735-2776.
62. Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. *Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells*. Cancer Res **1998**; 58: 2310-2315.
63. Betz M, Huxley P, Davies SJ, Mushtaq Y, Pieper M, Tschesche H et al. *A crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) complexed with a peptidomimetic hydroxamate primed-side inhibitor with a distinct selectivity profile*. Eur J Biochem **1997**; 247: 356-363.
64. Wojtowicz-Praga SW, Dickson RB, Hawkins MJ. *Matrix metalloproteinase inhibitors*. Invest New Drugs **1997**; 15: 61-75.
65. Millar AW, Brown PD, Moore J, Galloway WA, Cornish AG, Lenehan TJ. *Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in healthy male volunteers*. Br J Clin Pharmacol **1998**; 45: 21-26.
66. Brown PD. *Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors*. APMIS **1999**; 107: 174-180.
67. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, McDermott CD, Forsyth P, Edwards D et al. *Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials*. Ann N Y Acad Sci **1999**; 878: 236-270.
68. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. *Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple nonantimicrobial mechanisms*. Adv Dent Res **1998**; 12: 12-26.
69. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L et al. *Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer*. Dent Mater **2010**; 26: 571-578.
70. Zehnder M. *Root canal irrigants*. J Endod **2006**; 32: 389-398.
71. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. *Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine*. Clin Diagn Lab Immunol **1999**; 6: 437-439.

72. Ricci HA, Sanabe ME, De Sousa Costa CA, Pashley DH, Hebling J. *Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds*. Eur J Oral Sci **2010**; 118: 411-416.
73. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. *Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing*. J Dent **2009**; 37: 108-114.
74. De Munck J, Mine A, Van Den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G et al. *Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives*. Eur J Oral Sci **2010**; 118: 494-501.
75. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. *Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo*. J Dent Res **2005**; 84: 741-746.
76. Kim YK, Mai S, Mazzoni A, Liu Y, Tezvergil-Mutluay A, Takahashi K et al. *Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices—Implications in the aging of resin-dentin bonds*. Acta Biomater **2010**; 6: 3729-3739.
77. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M et al. *The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs*. J Dent Res **2011**; 90: 535-540.
78. Kanca J. *One step bond strength to enamel and dentin*. Am J Dent **1997**; 10: 5-8.
79. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. *Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy*. J Dent Res **2010**; 89: 1499-1504.
80. Li X, Wu JF. *Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs)*. Recent Pat Anticancer Drug Discov **2005**; 5: 109-141.
81. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. *Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review*. Dent Mater **2005**; 21: 895-910.
82. Teresa Barros M, Mouquinho AI, Petrova TK, Saavedra DM, Sotomayor JC. *Fast synthesis employing a microwave assisted neat protocol of new monomers potentially useful for the preparation of PDLC films*. Cent. Eur. J. Chem. **2011**; 9: 557-566.
83. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*. Chichester: Wiley; **2005**.
84. Ellman GL. *Tissue sulfhydryl groups*. Archives of Biochemistry and Biophysics **1959**; 82: 70-77.
85. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. Anal Bioanal Chem **2002**; 373: 266-276.
86. Perrin DD, Armarego WLF. *Purification of laboratory chemicals*. Oxford: Pergamon; **1988**.
87. Strydom B, Bergh JJ, Petzer JP. *The inhibition of monoamine oxidase by 8-(2-phenoxyethoxy) caffeine analogues*. Arzneimittelforschung **2012**; 62: 513-518

Capitulo V Anexos

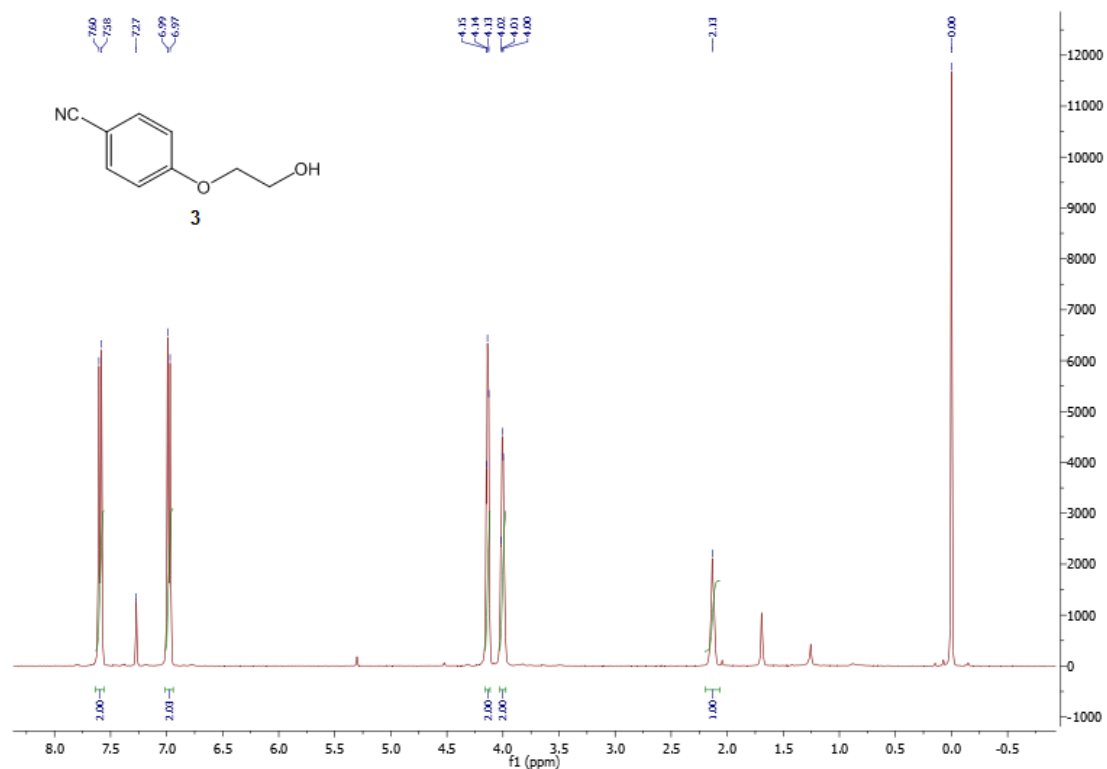


Figura 5.1: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.

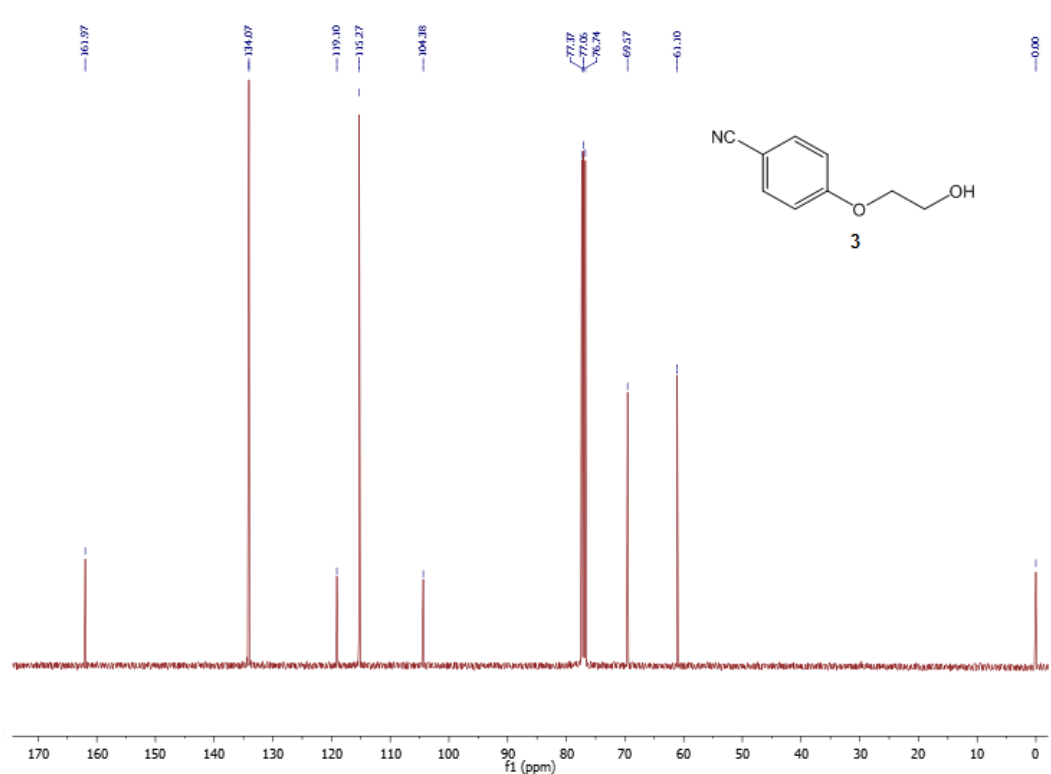


Figura 5.2: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.

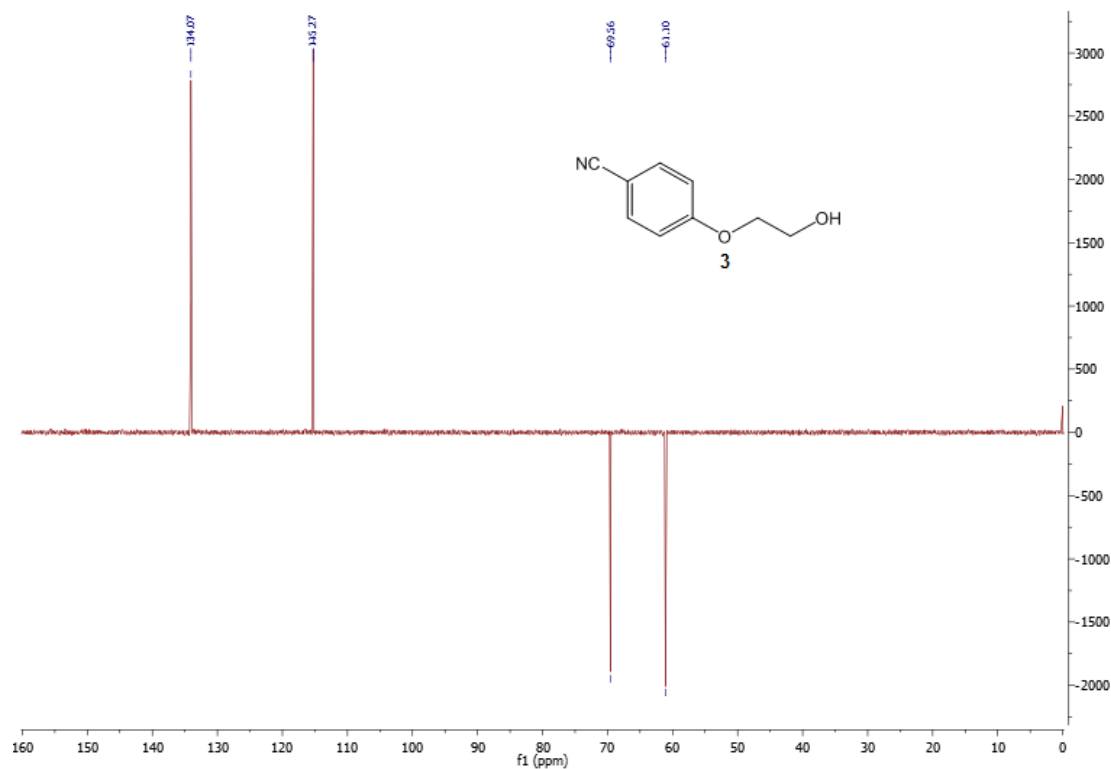


Figura 5.3: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.

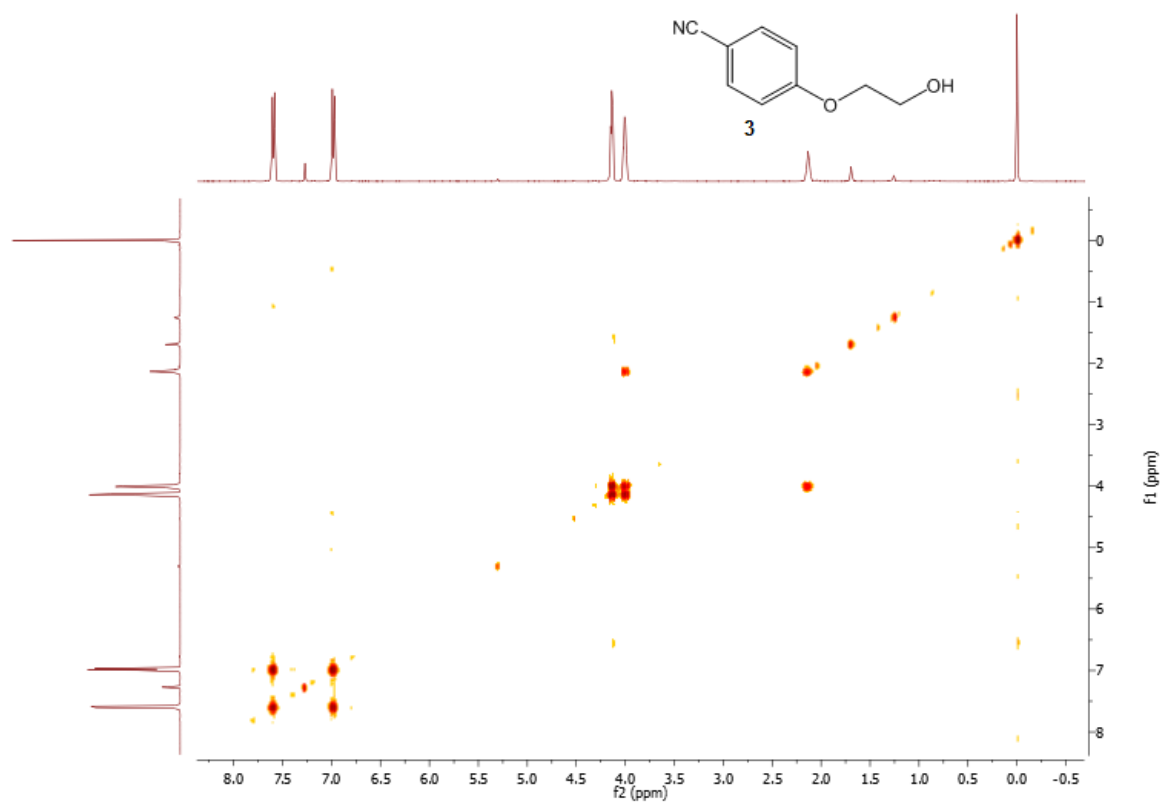
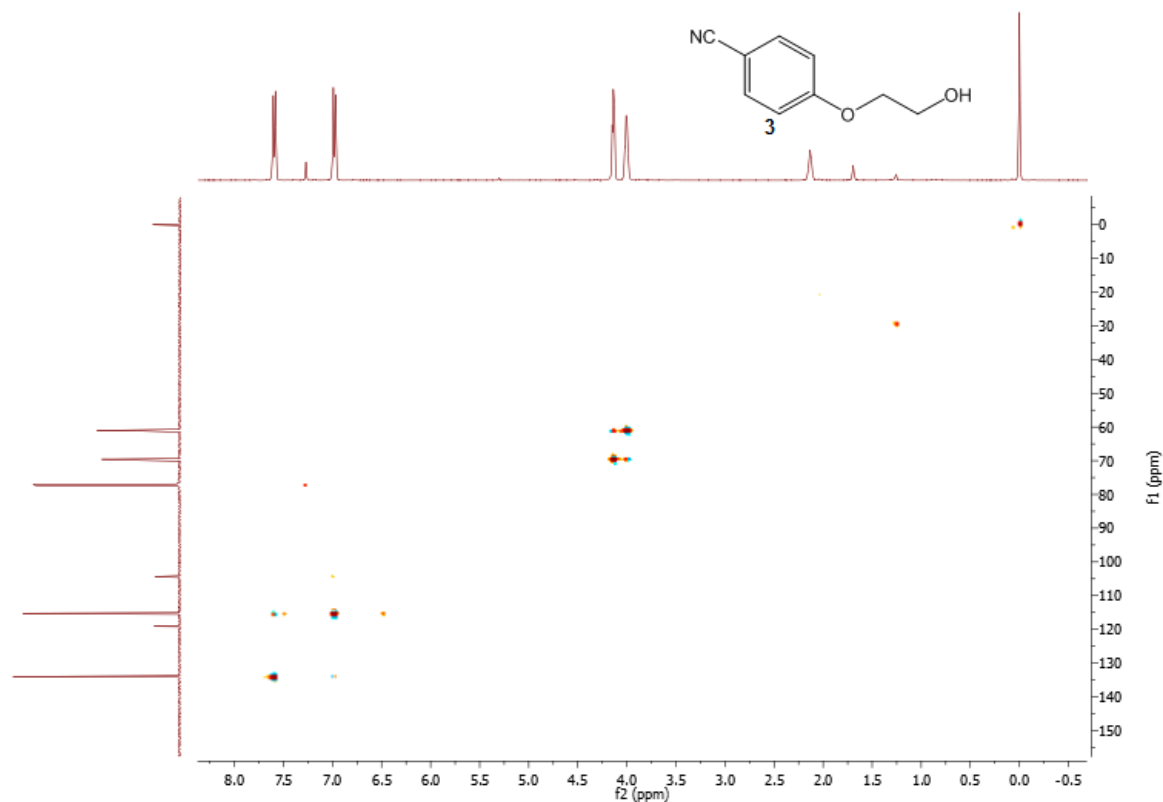
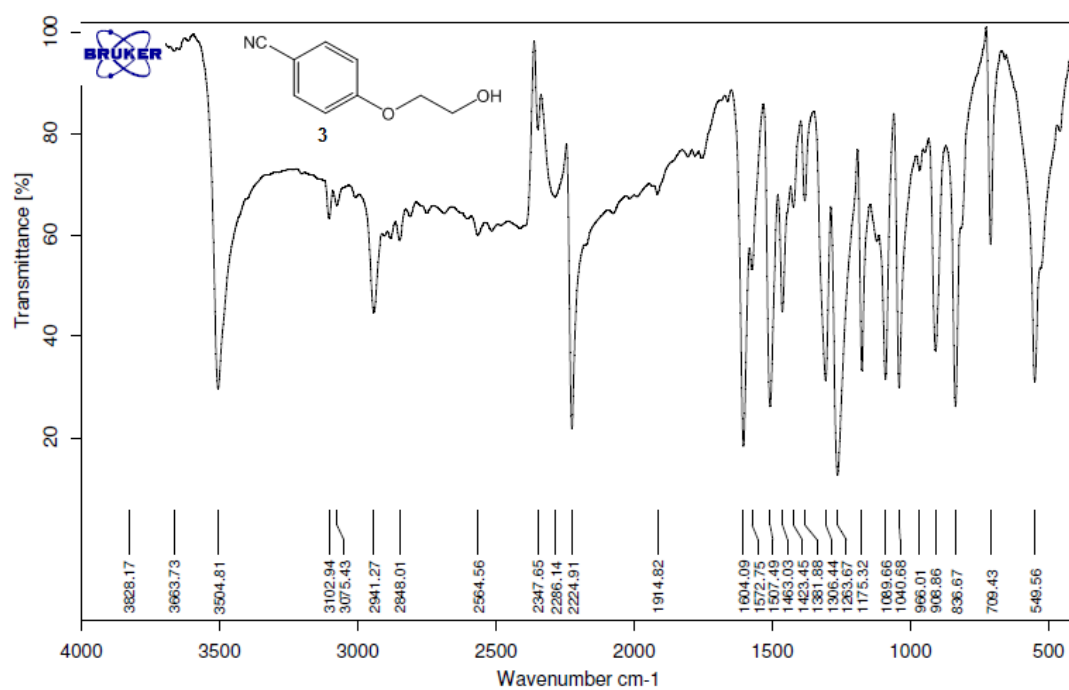


Figura 5.4: Espectro de COSY (CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.

Figura 5.5: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.Figura 5.6: Espectro de Infravermelho (KBr) do 2-(4-cianofenol)etanol, **3**.

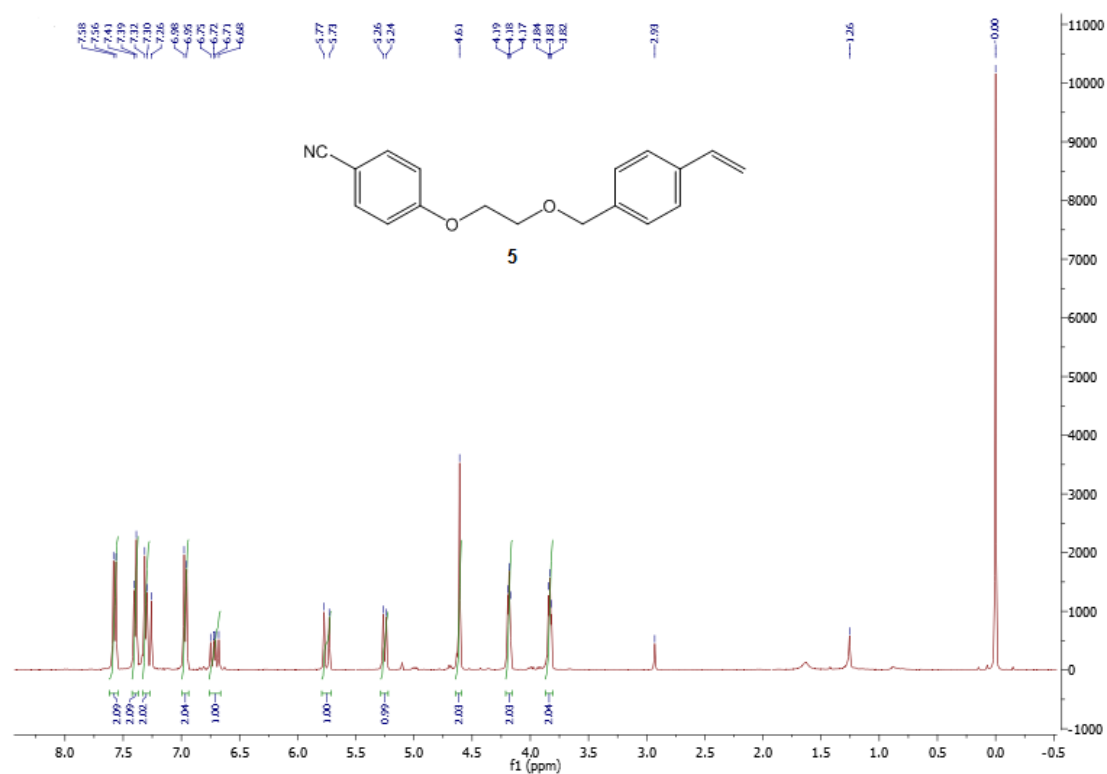


Figura 5.7: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**.

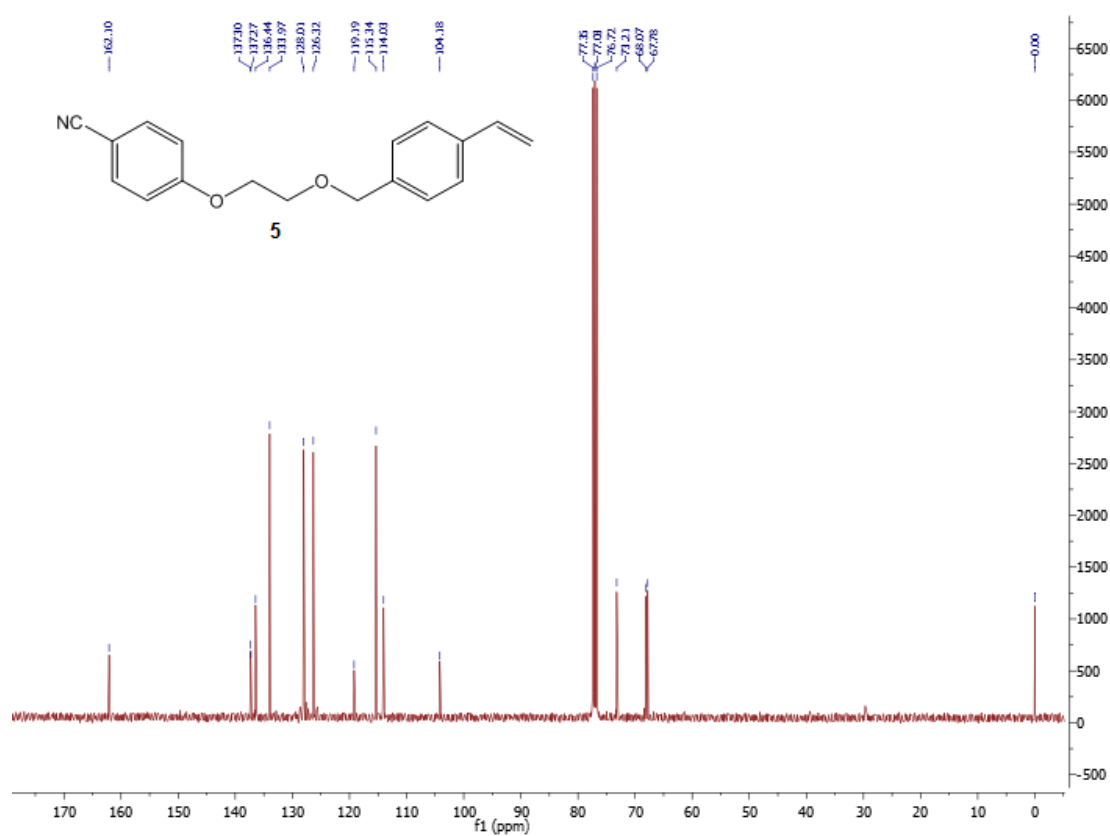


Figura 5.8: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**.

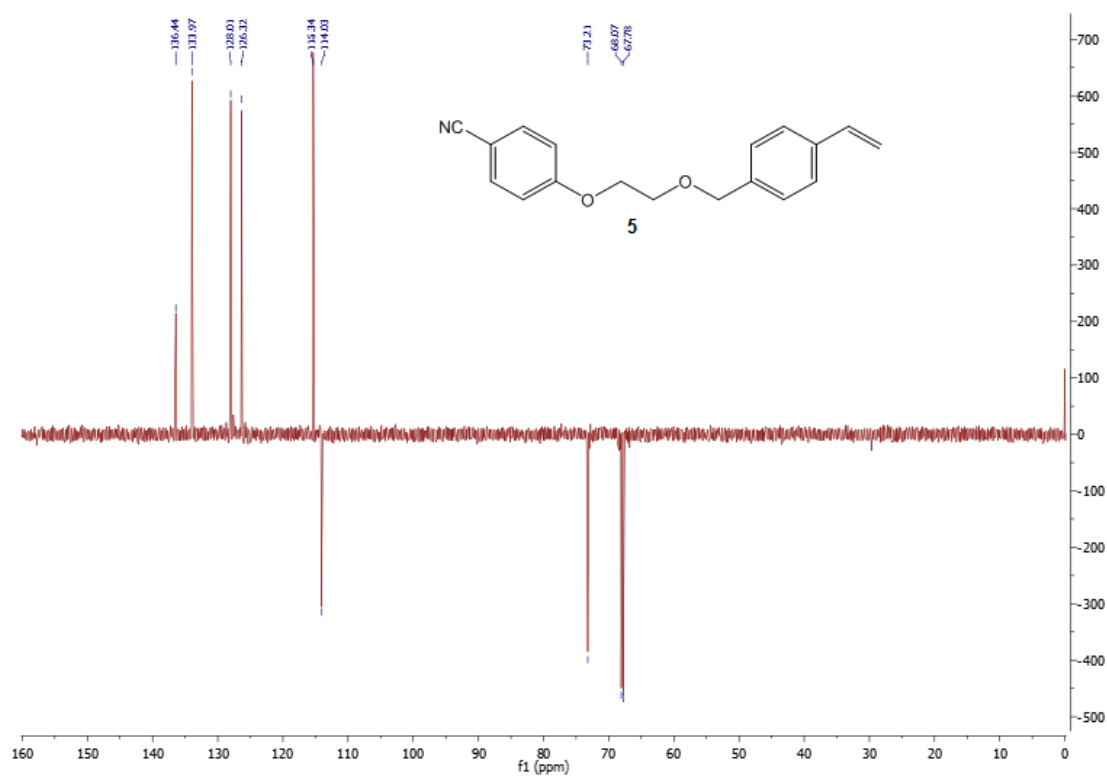


Figura 5.9: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**.

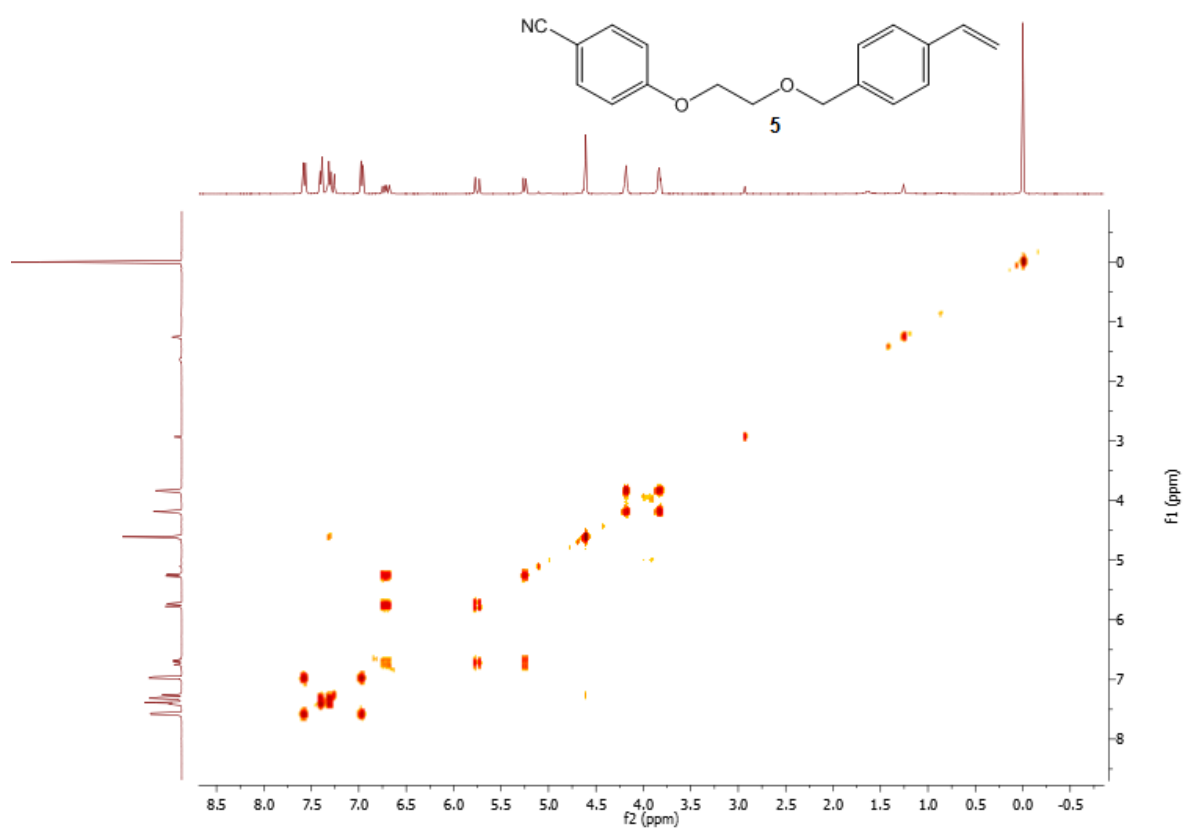
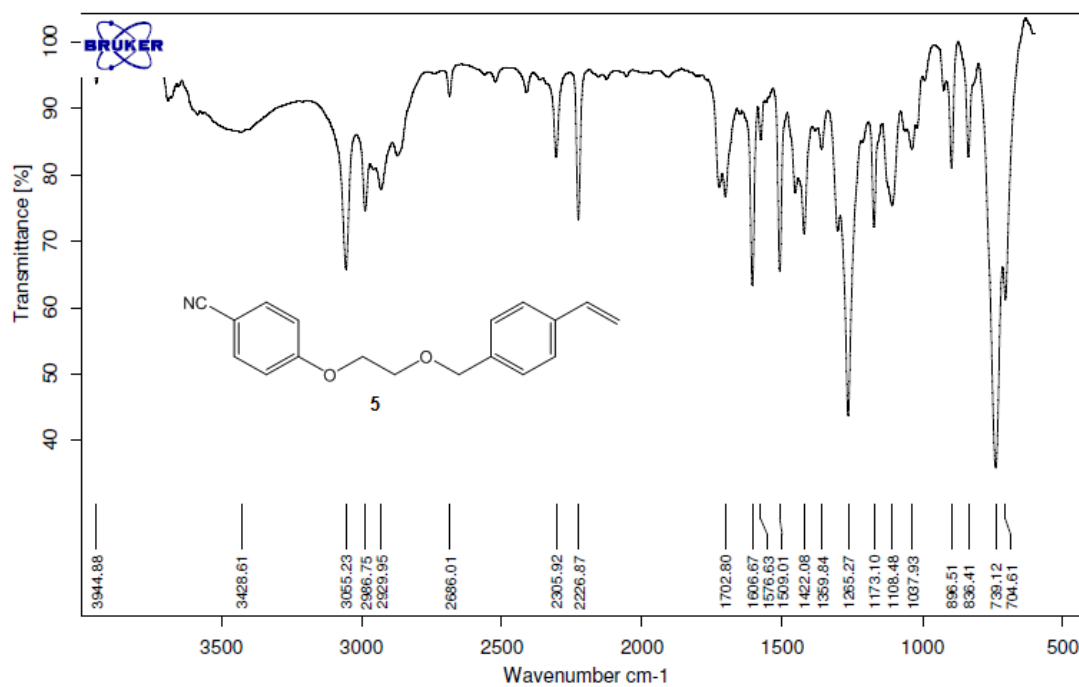
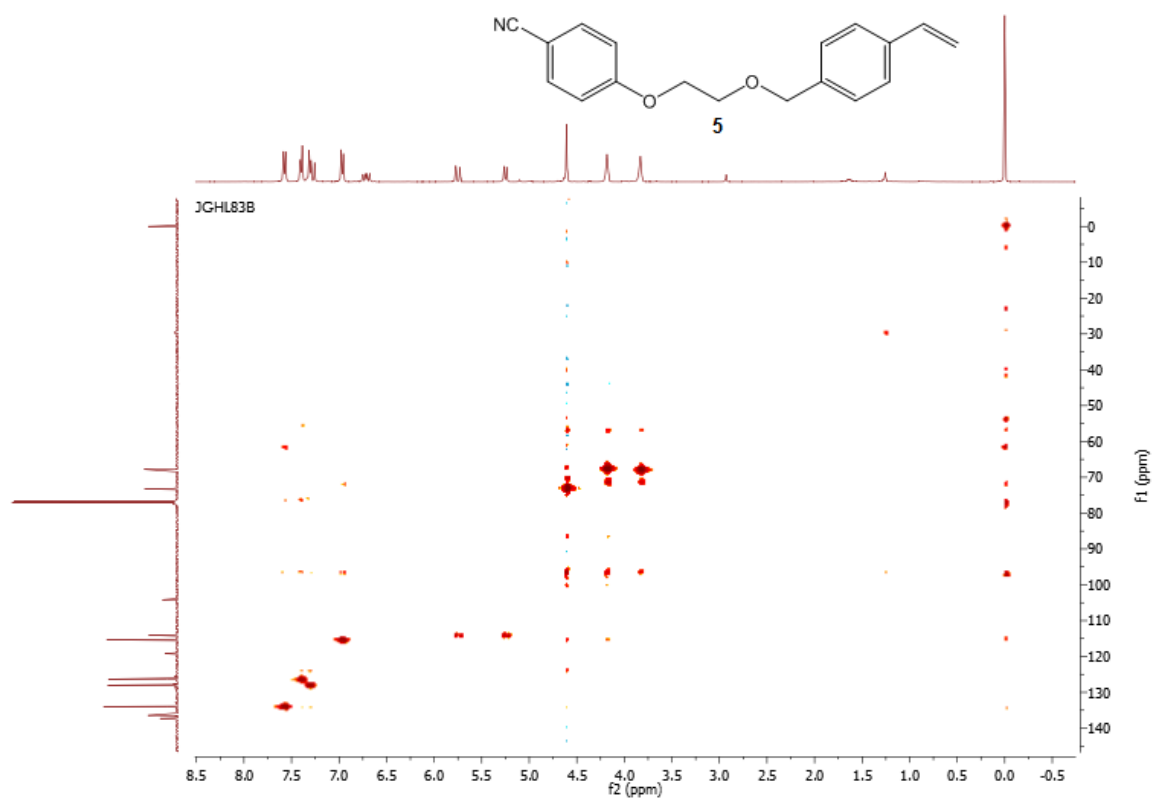


Figura 5.10: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-(2-((4-vinilbenzil)oxi)etoxi)benzonitrilo, **5**.



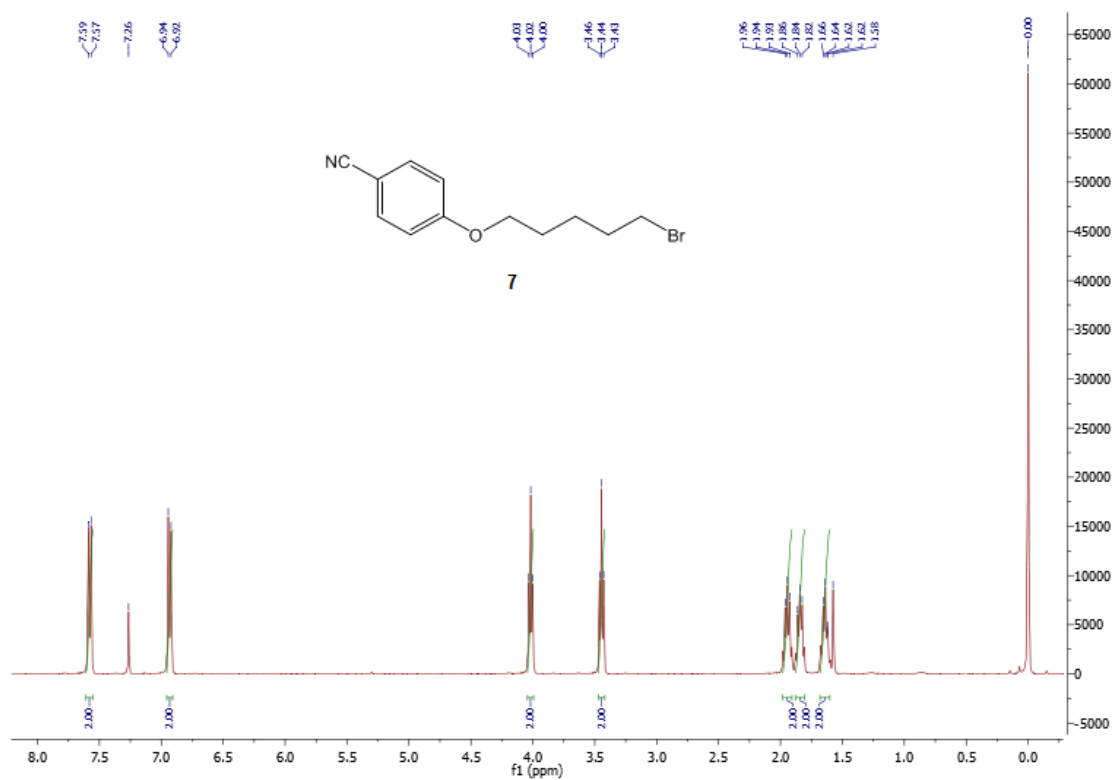


Figura 5.13: Espectro de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

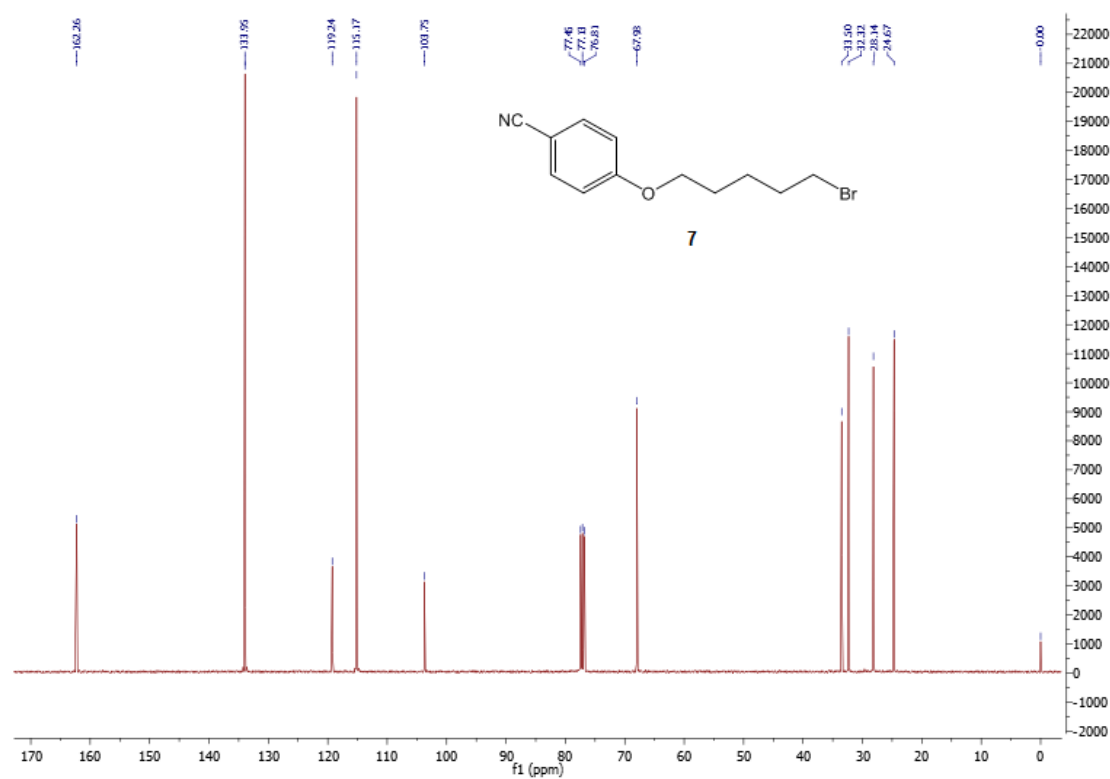


Figura 5.14: Espectro de ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

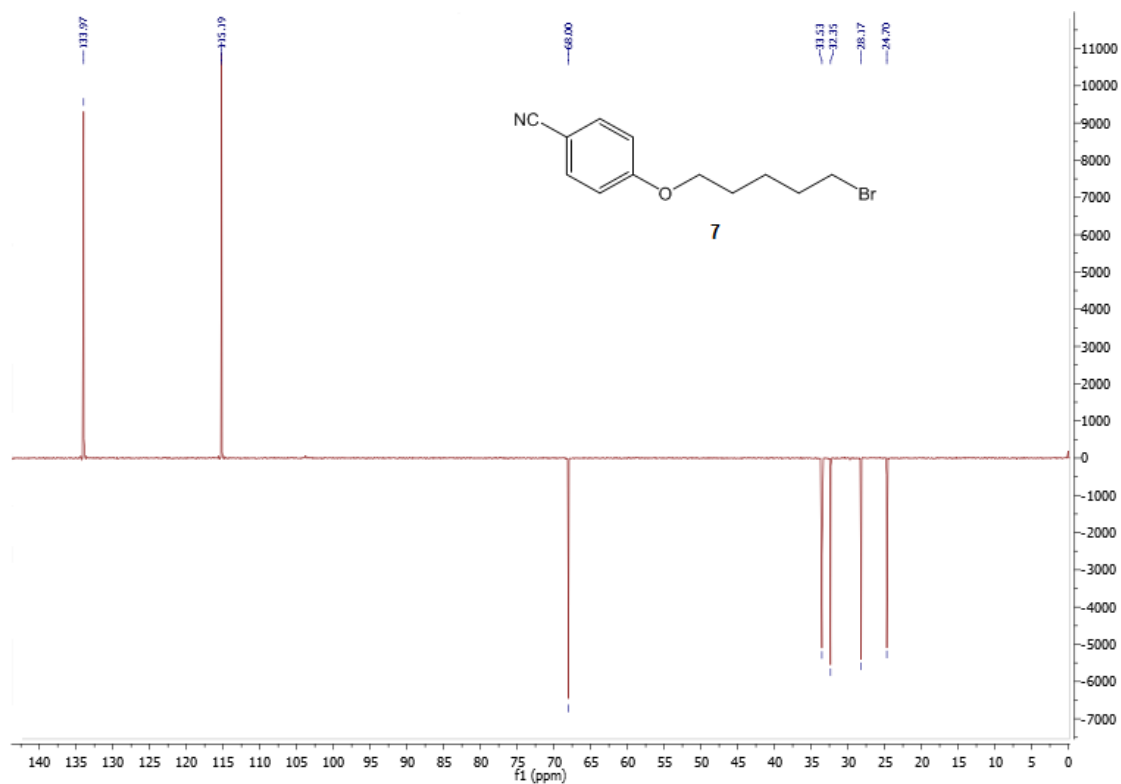


Figura 5.15: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

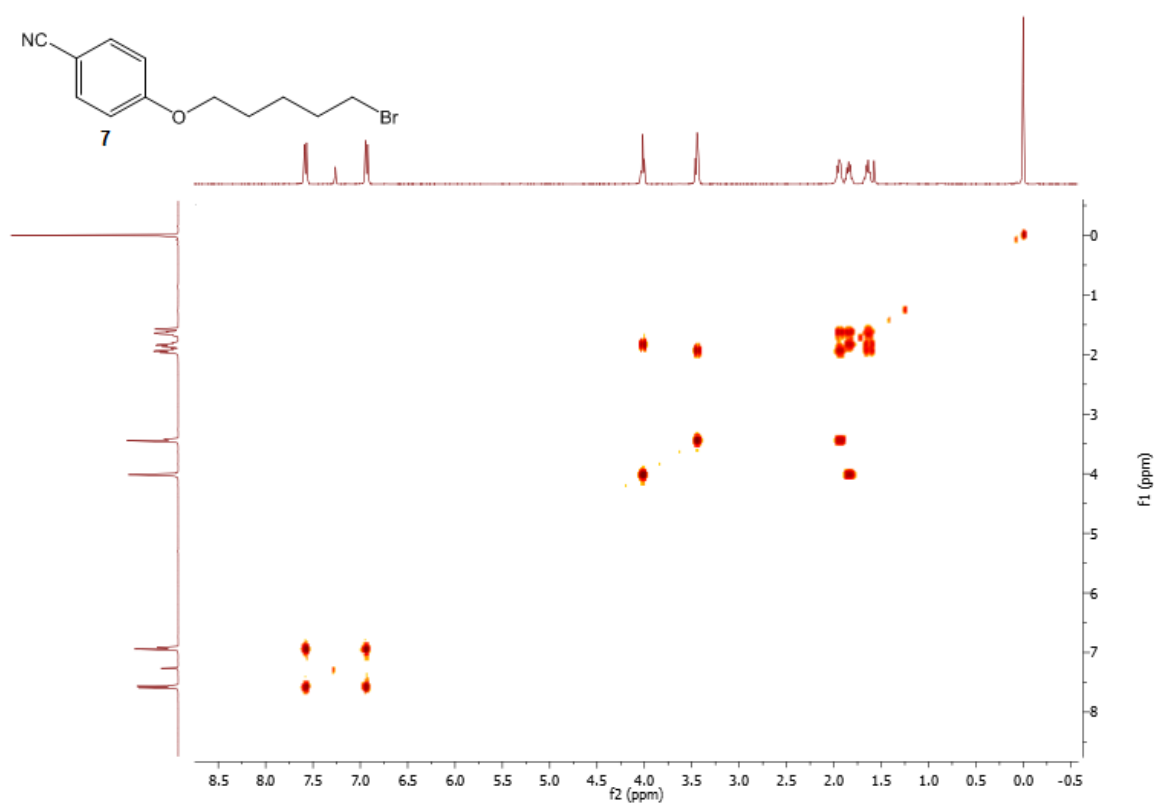


Figura 5.16: Espectro de COSY (CDCl₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

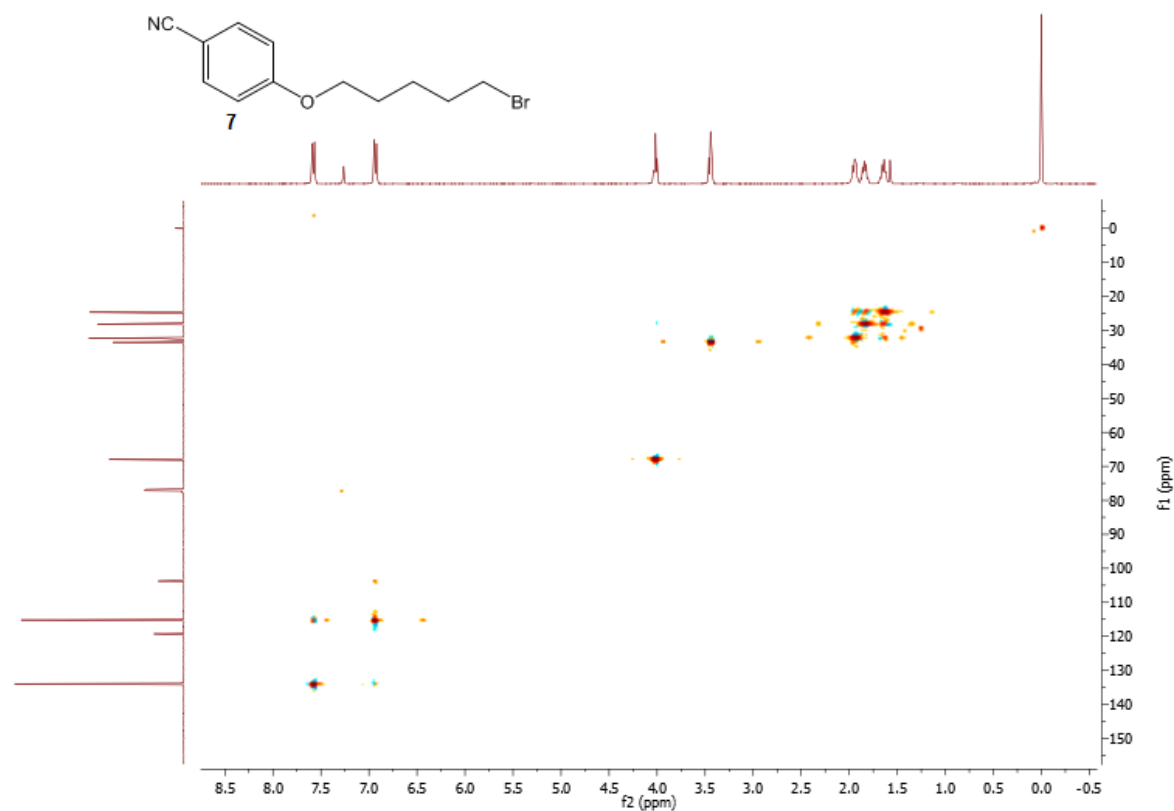


Figura 5.17: Espectro de HMQC (CDCl₃) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

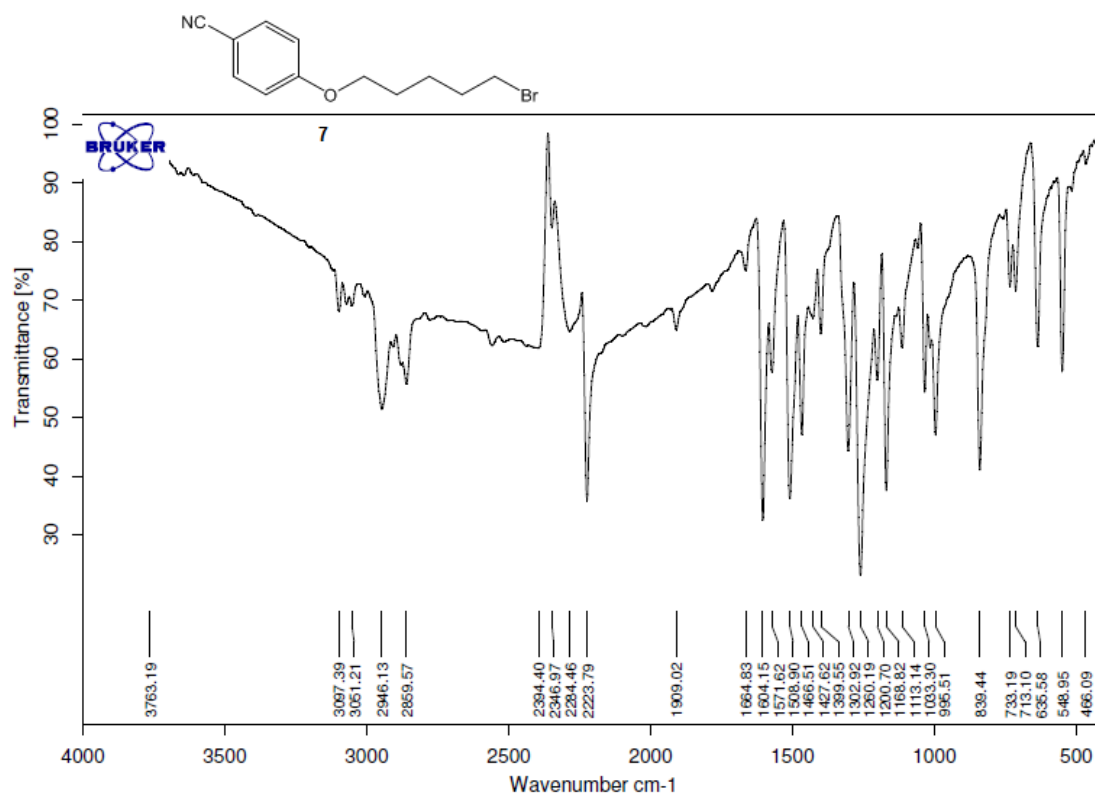


Figura 5.18: Espectro de Infravermelho (KBr) do 4-[(5-bromopentil)oxi]benzonitrilo, 7.

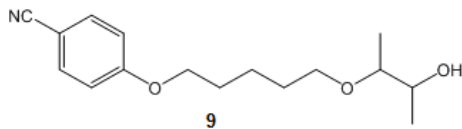


Figura 5.19: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-((5((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, 9.

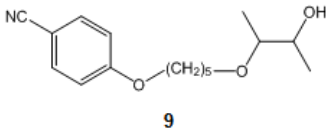


Figura 5.20: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **9**.

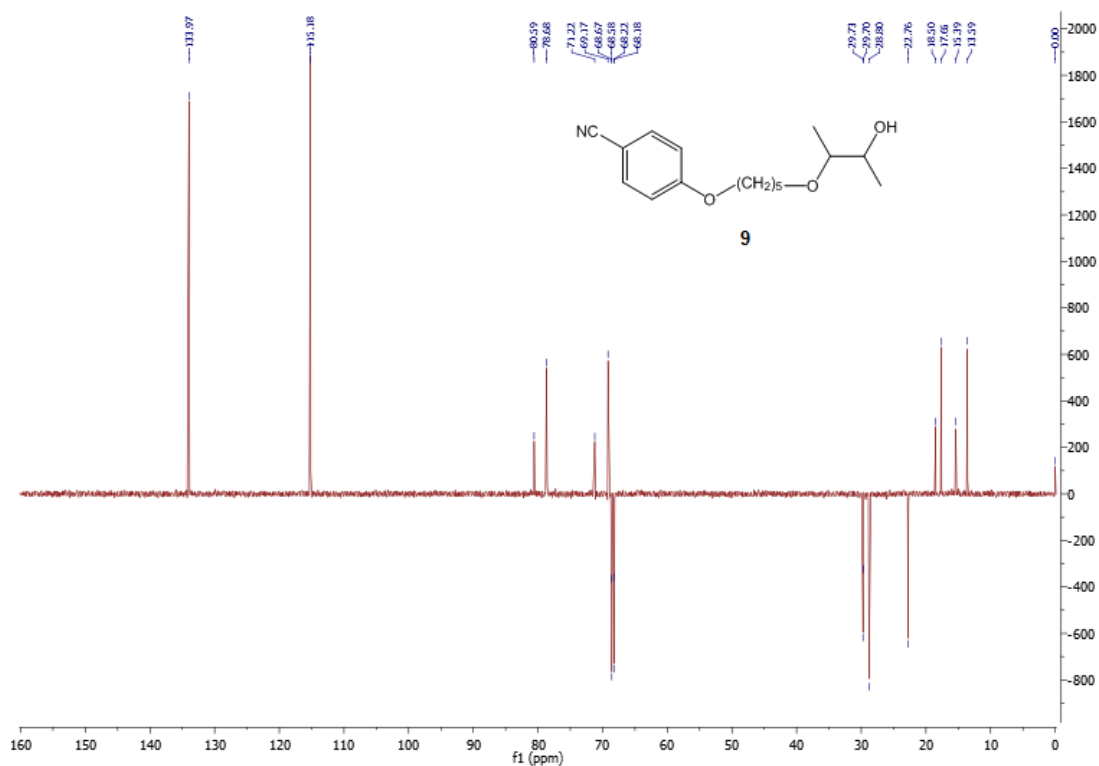


Figura 5.21: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **9**.

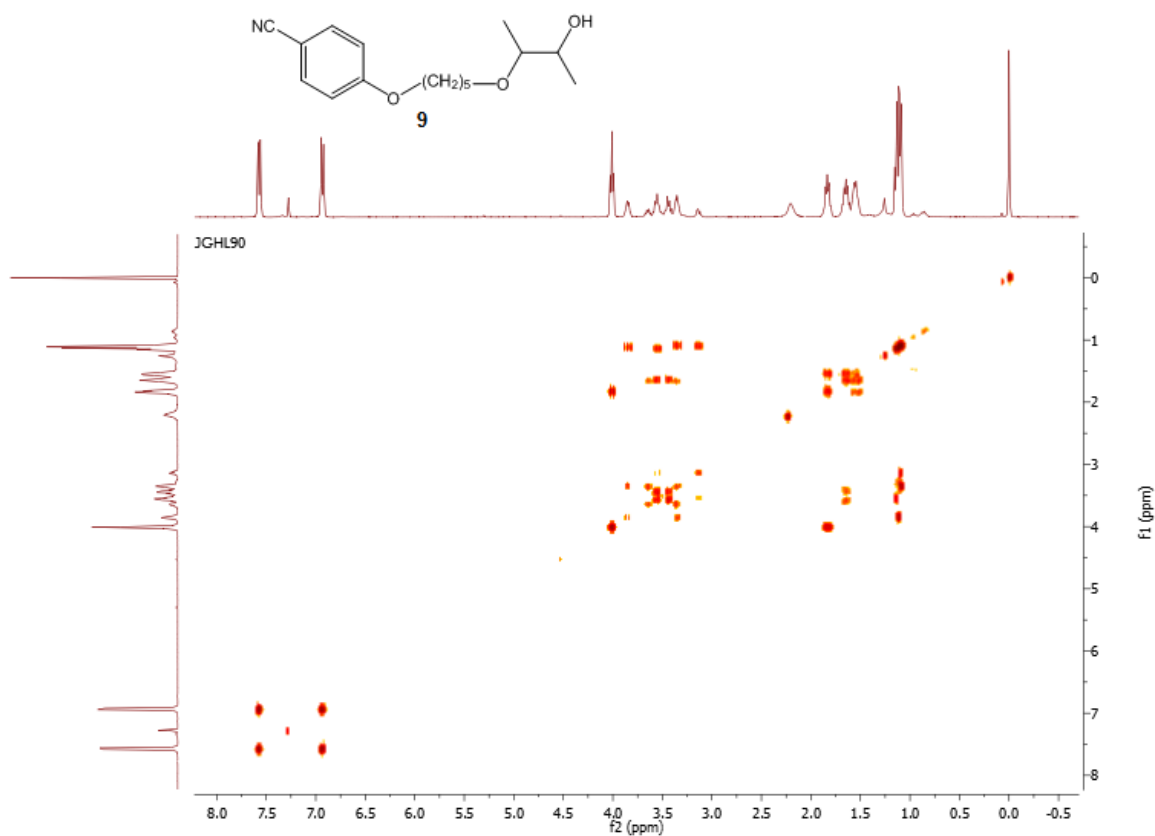
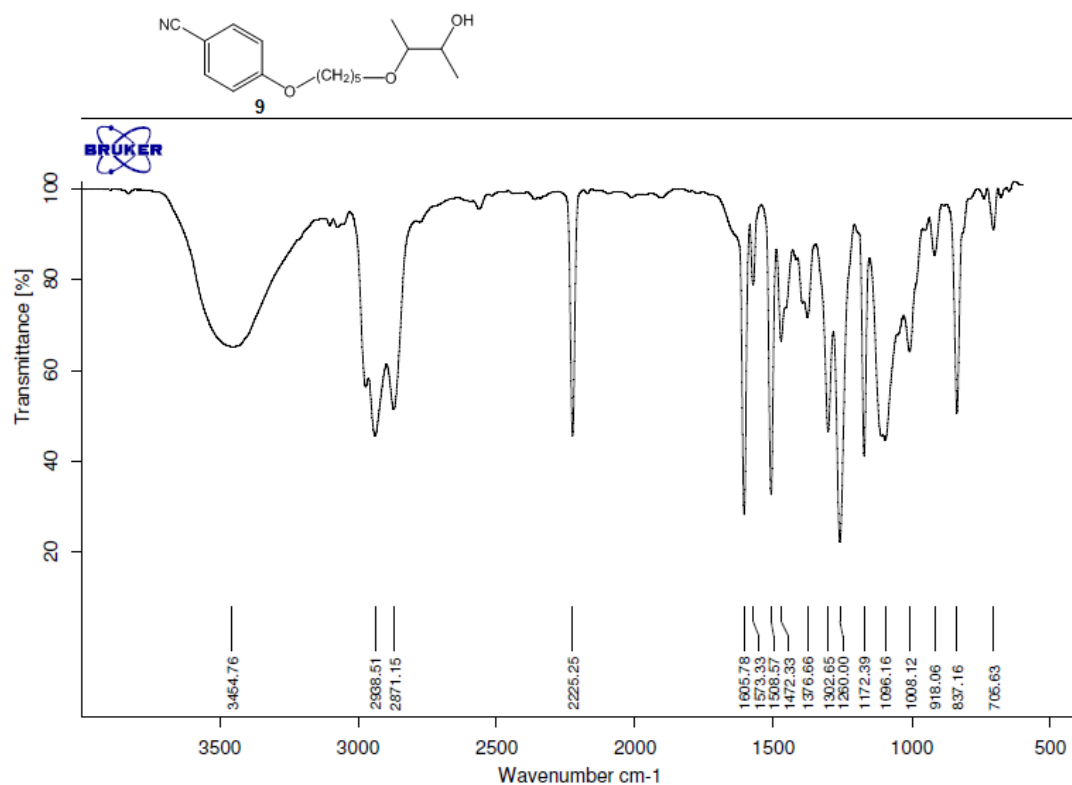
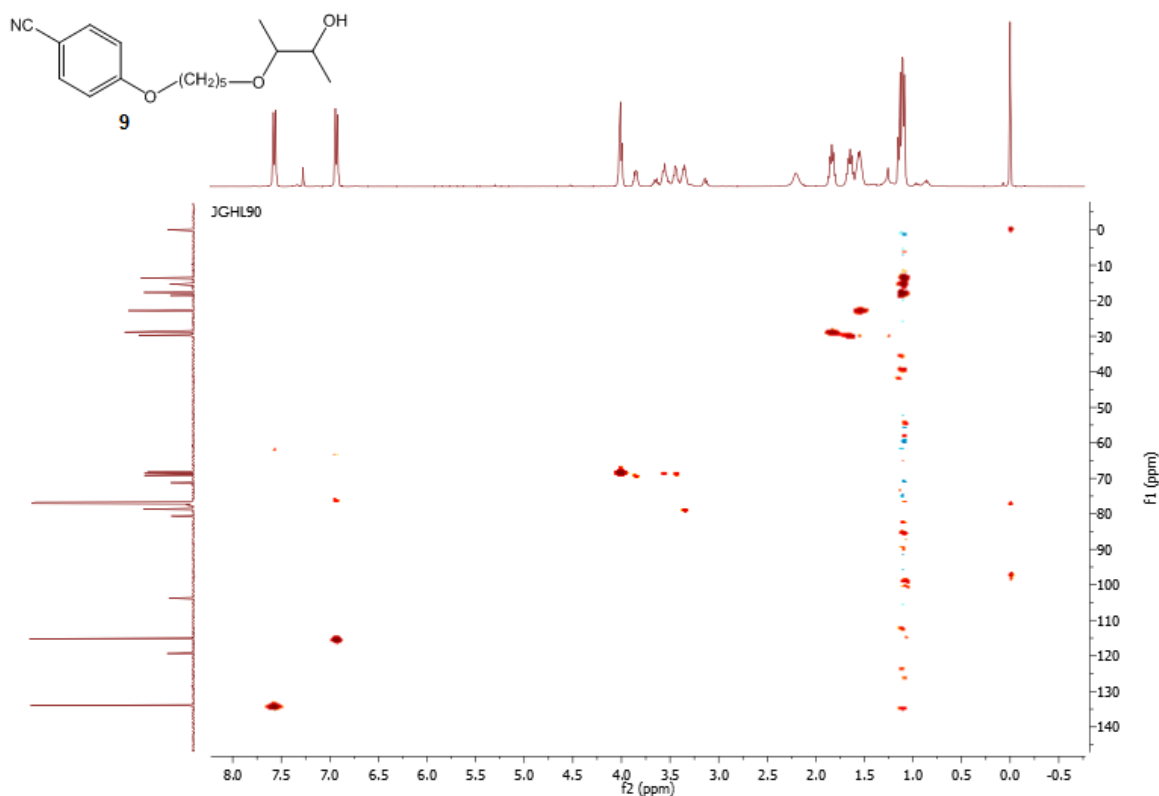


Figura 5.22: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-((5((3-hidroxibutan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **9**.



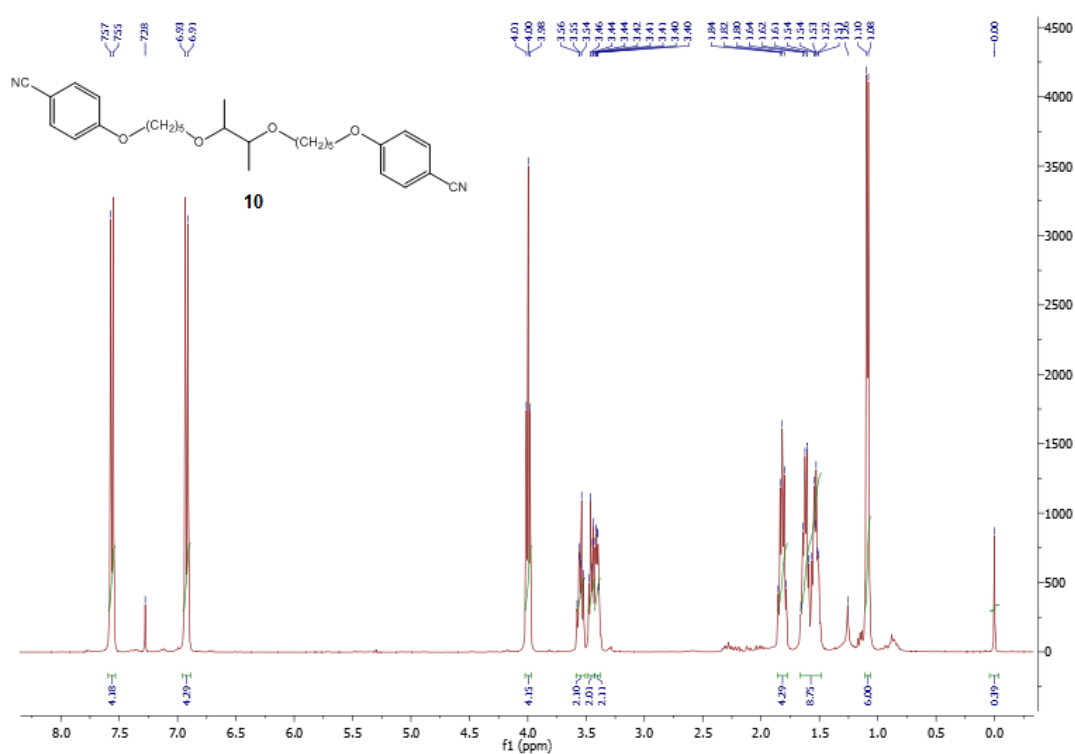


Figura 5.25: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi)dibenzonitrilo, **10**.

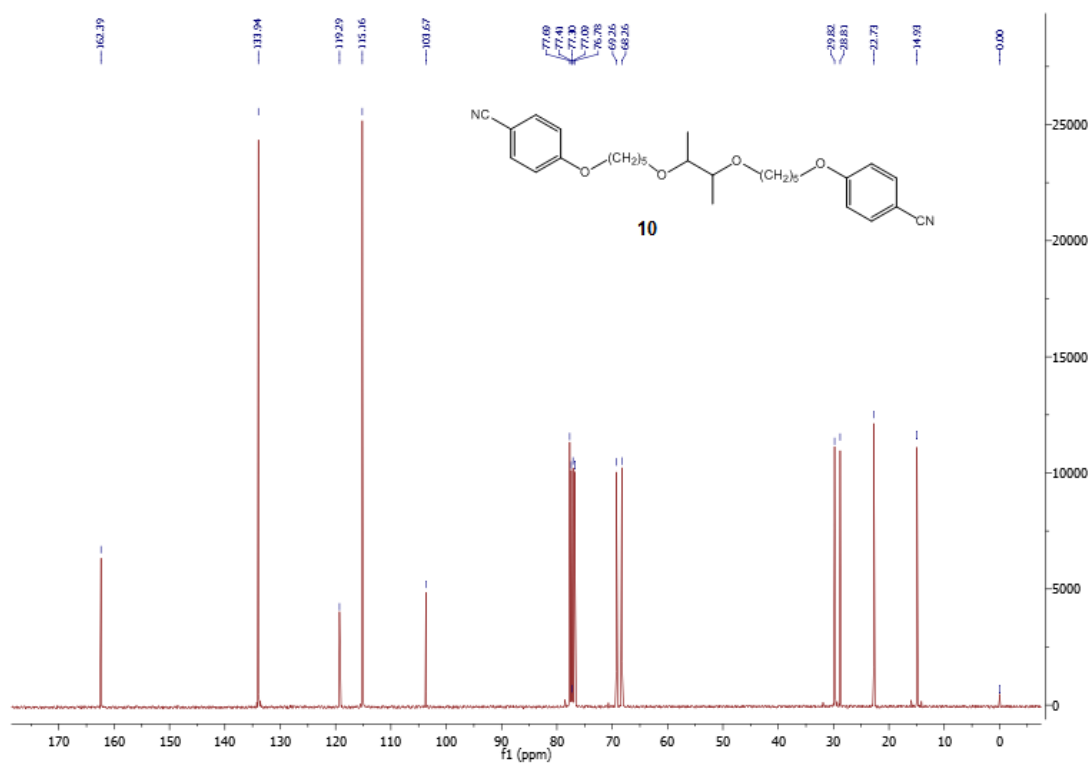


Figura 5.26: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**.

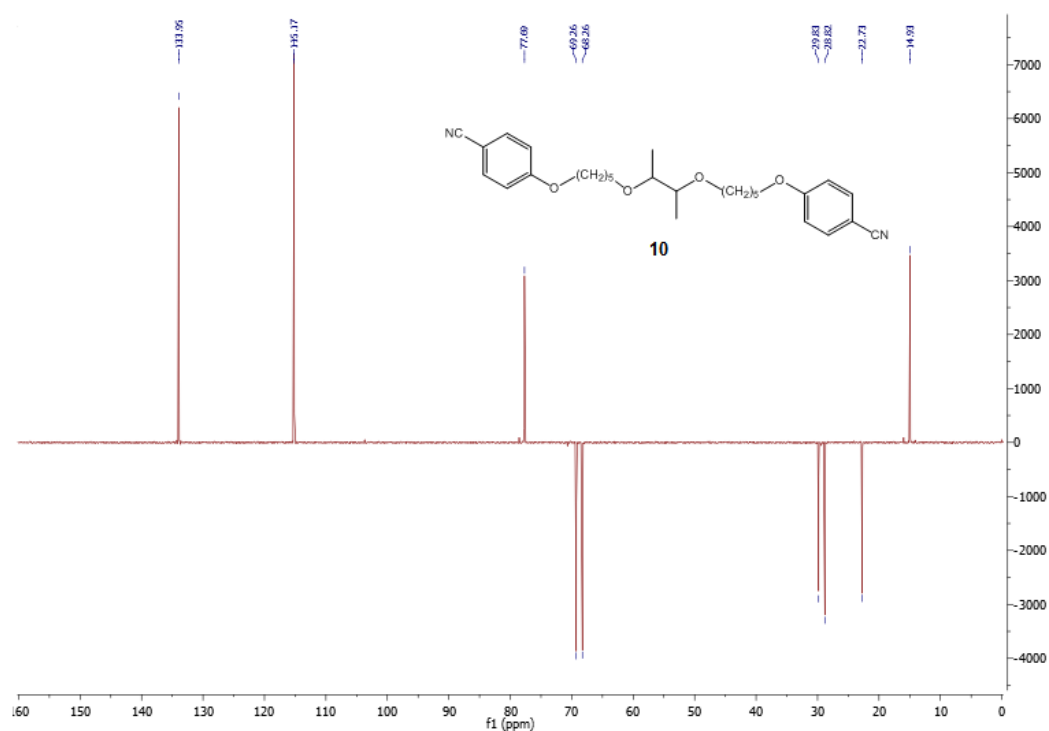


Figura 5.27: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**.

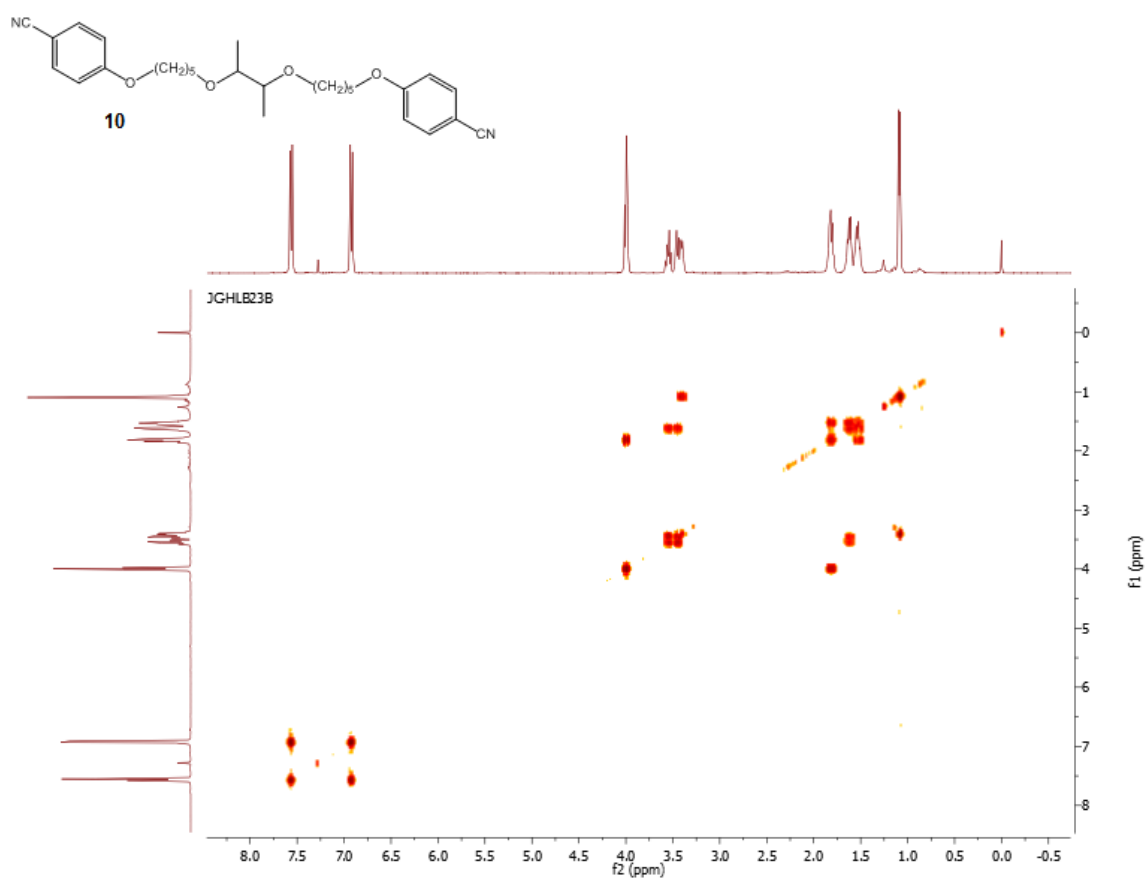


Figura 5.28: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**.

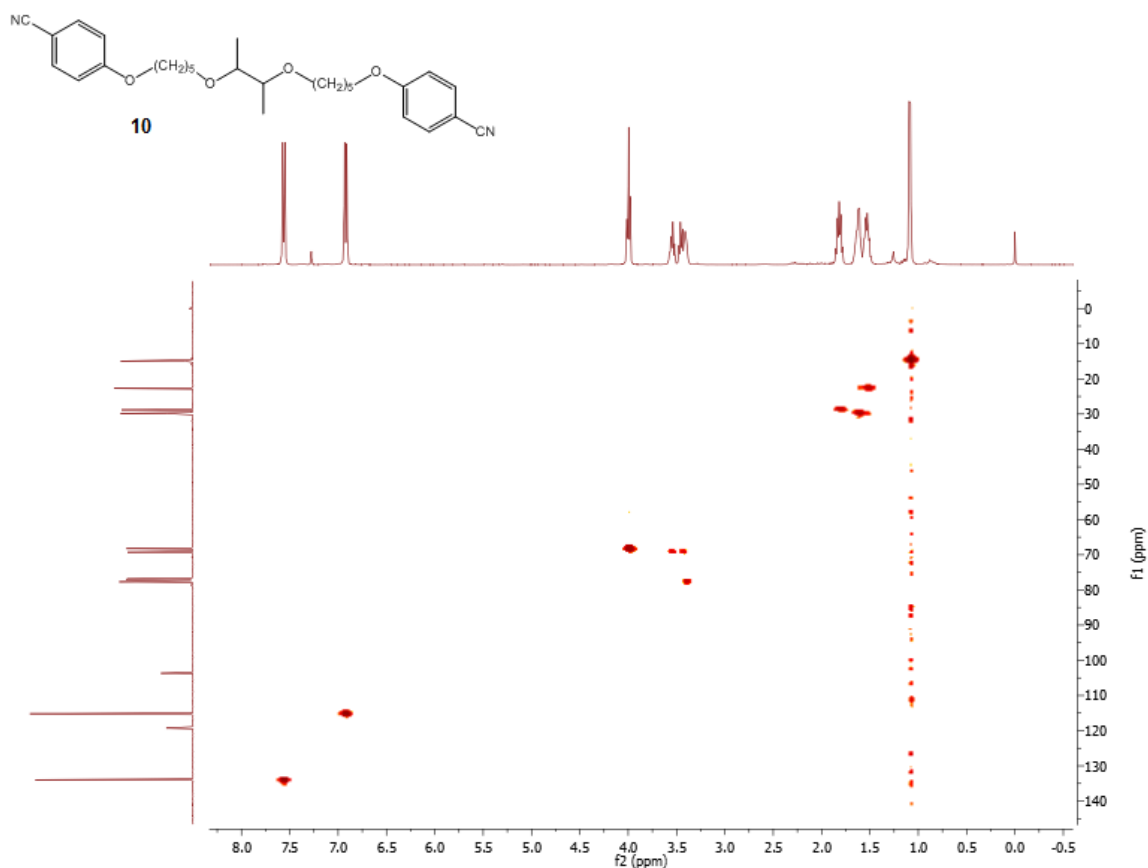


Figura 5.29: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**.

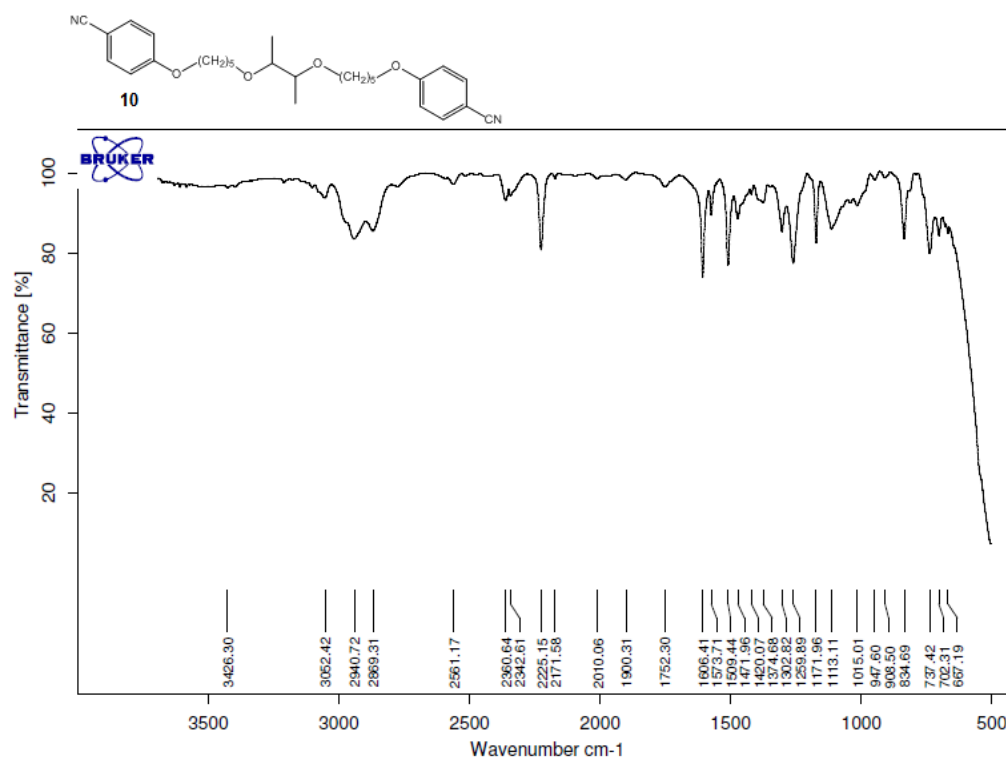


Figura 5.30: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4,4'-(((butano-2,3-diilbis(oxi))bis(pentano-5,1-diil))bis(oxi))dibenzonitrilo, **10**.

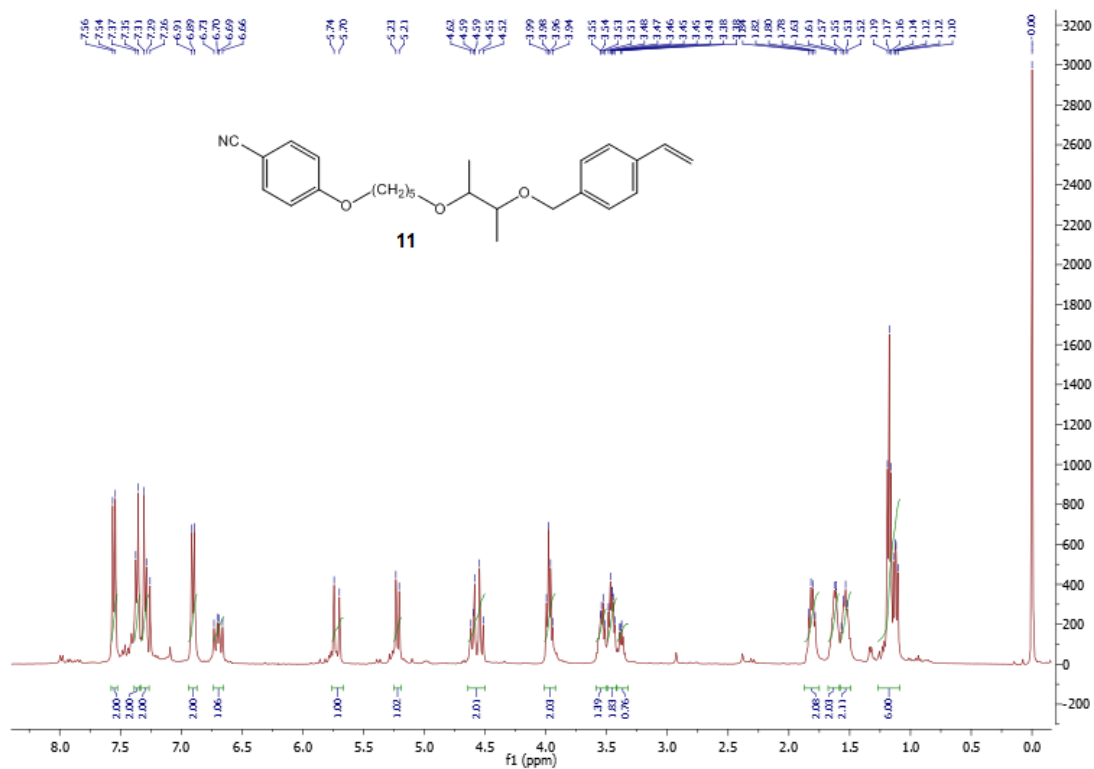


Figura 5.31: Espectro de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

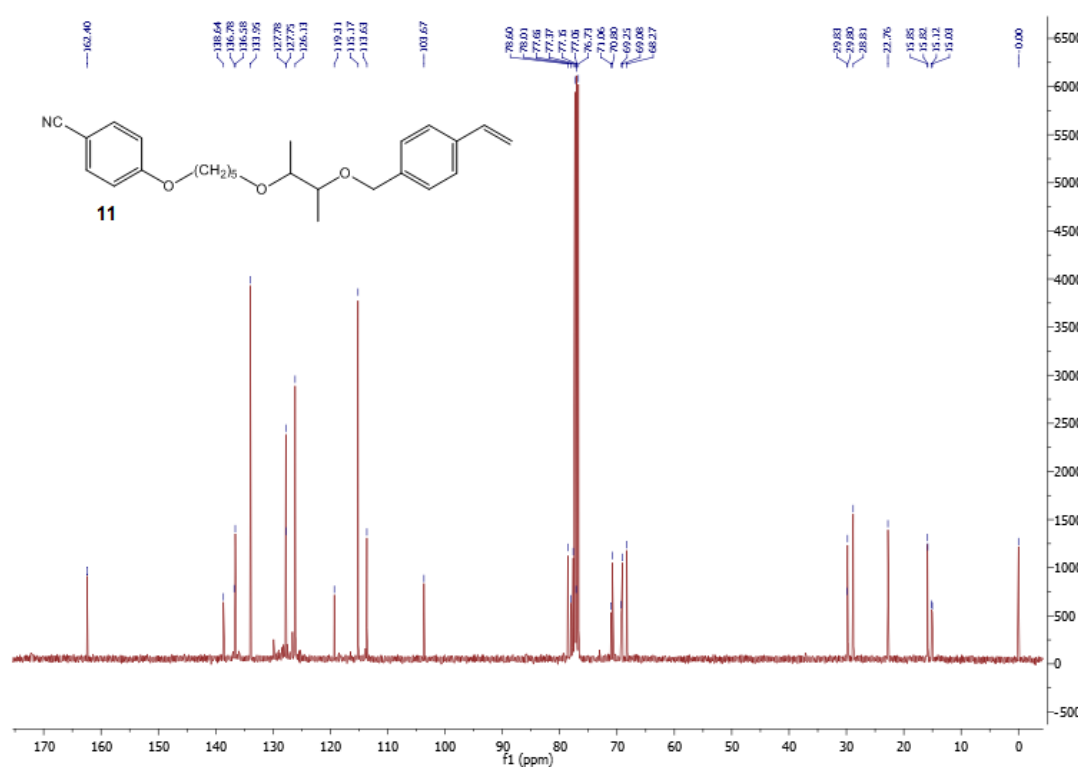


Figura 5.32: Espectro de ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

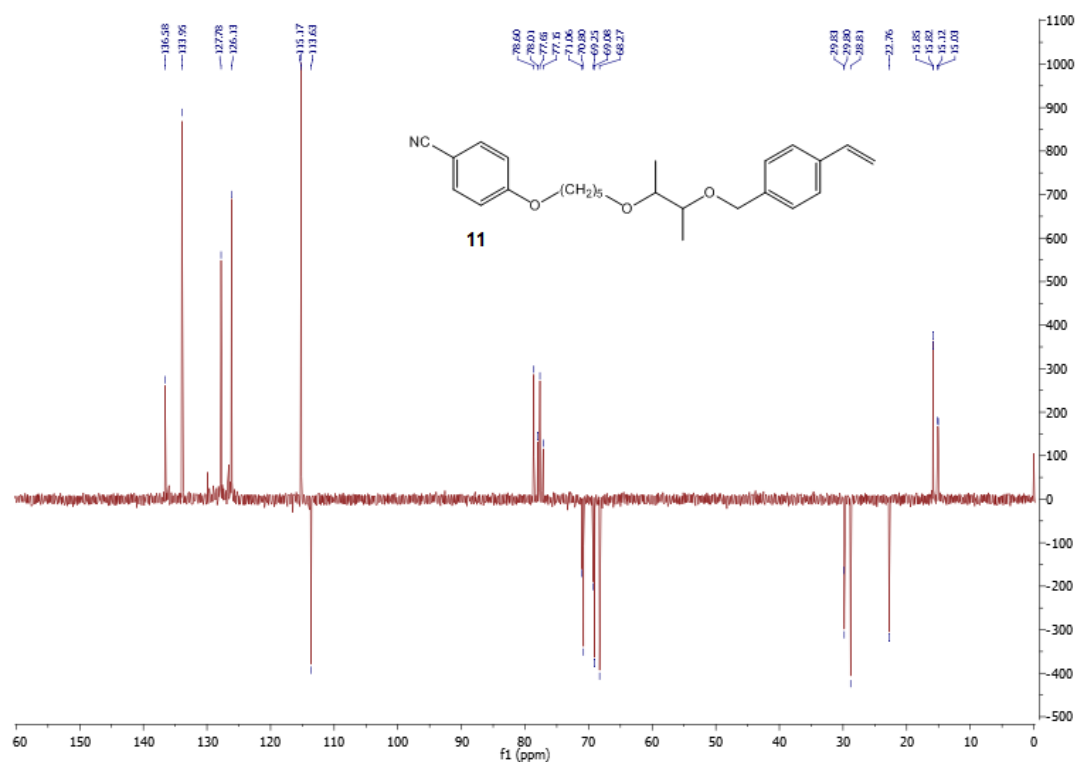


Figura 5.33: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

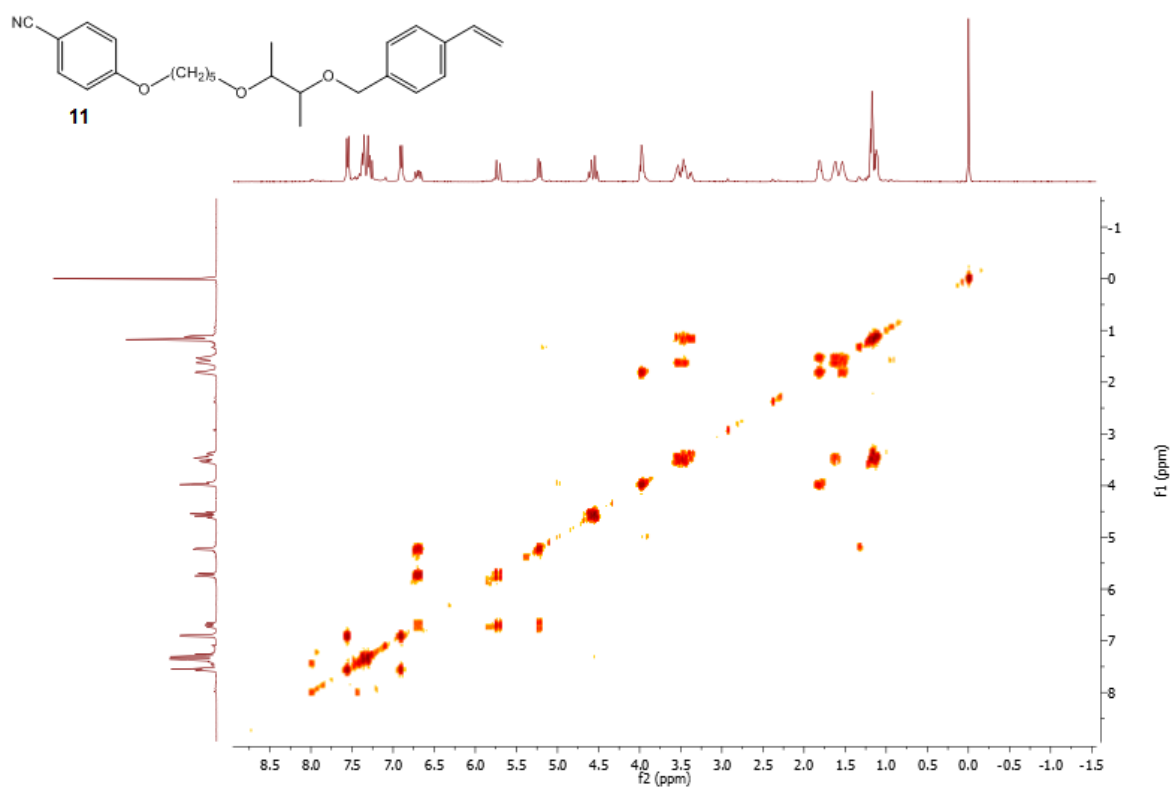


Figura 5.34: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

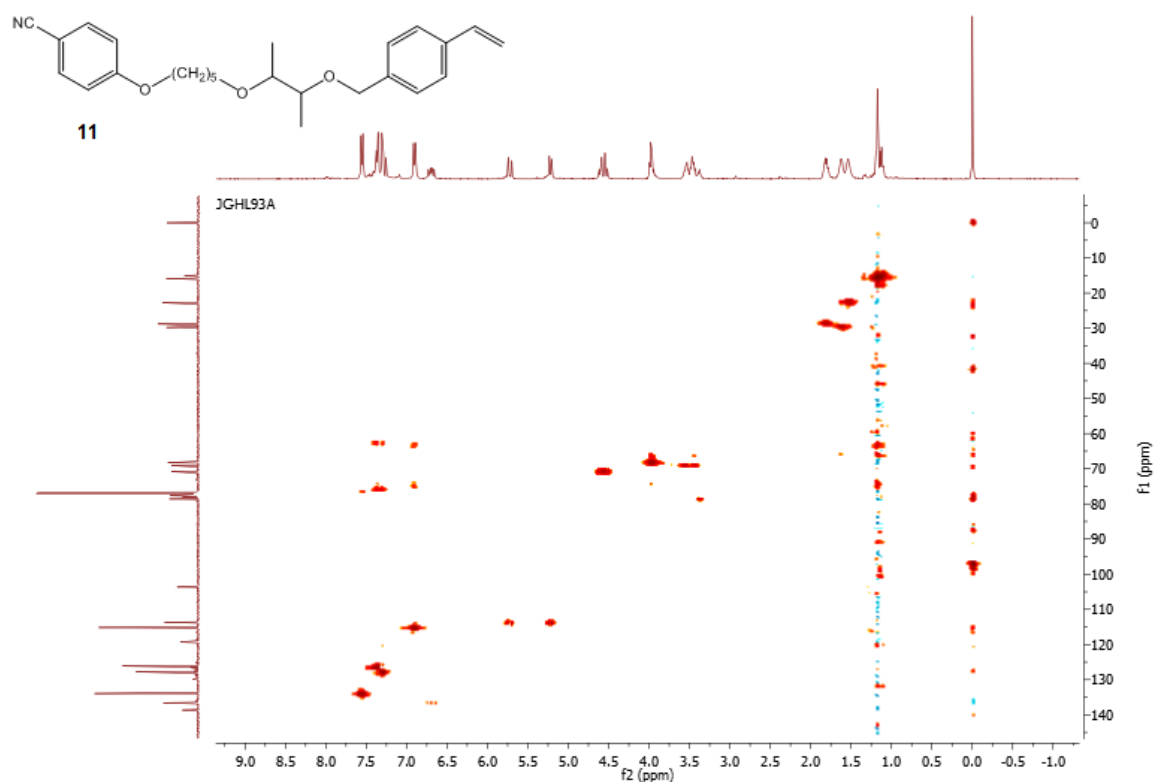


Figura 5.35: Espectro de HMBC (CDCl_3) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

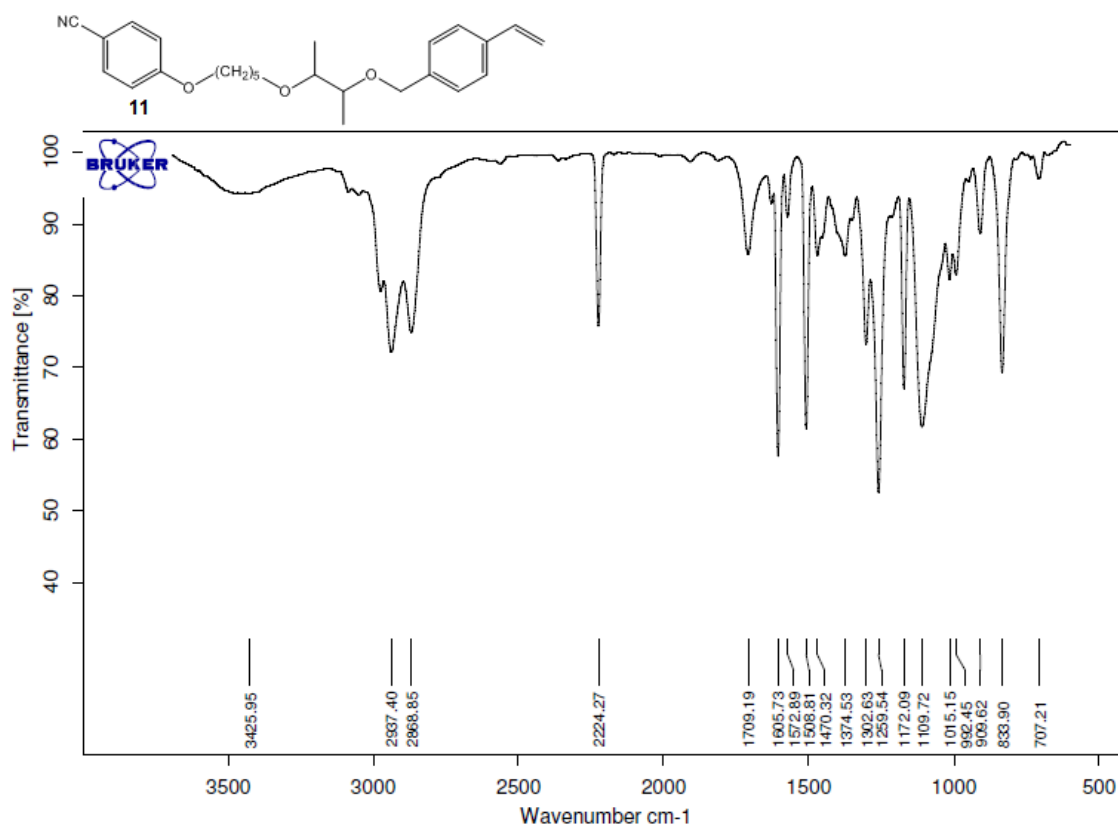


Figura 5.36: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-((3-((4-vinilbenzil)oxi)butan-2-il)oxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **11**.

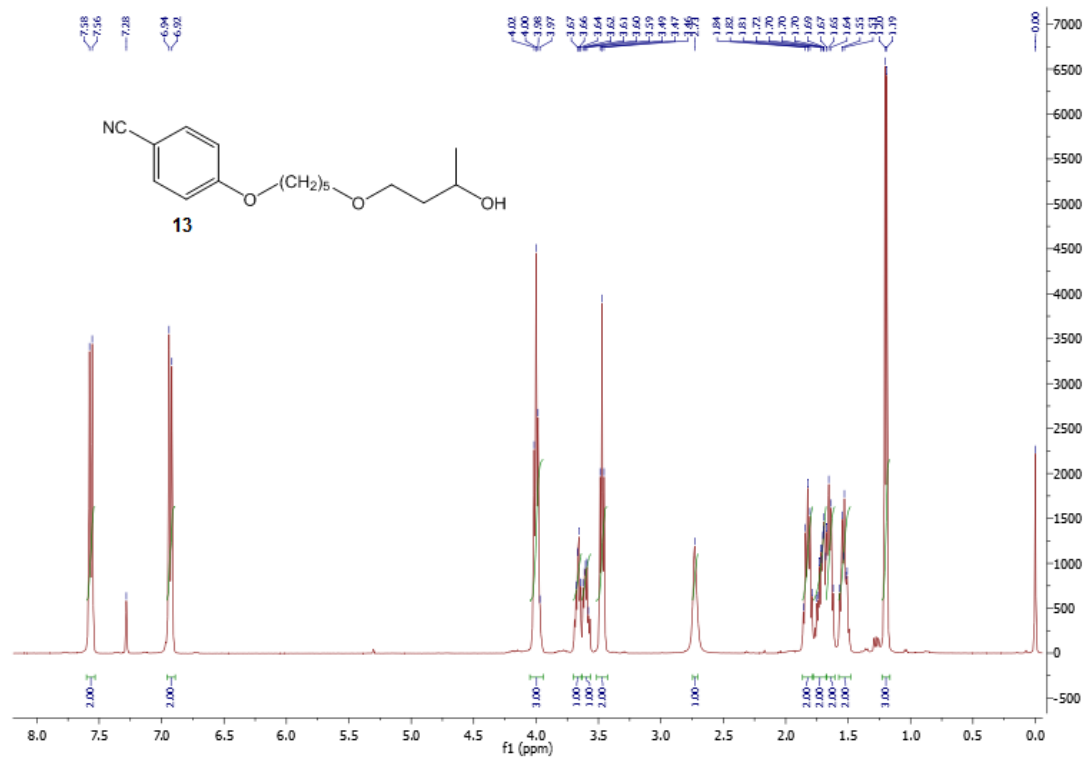


Figura 5.37: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

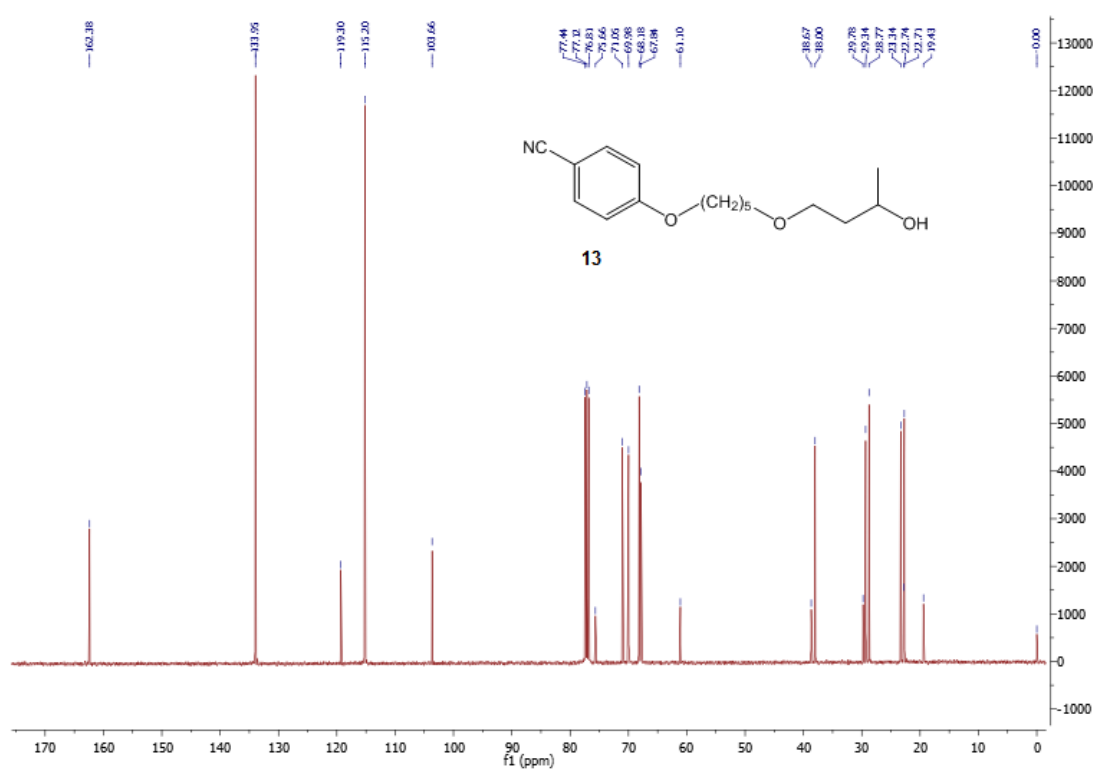


Figura 5.38: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

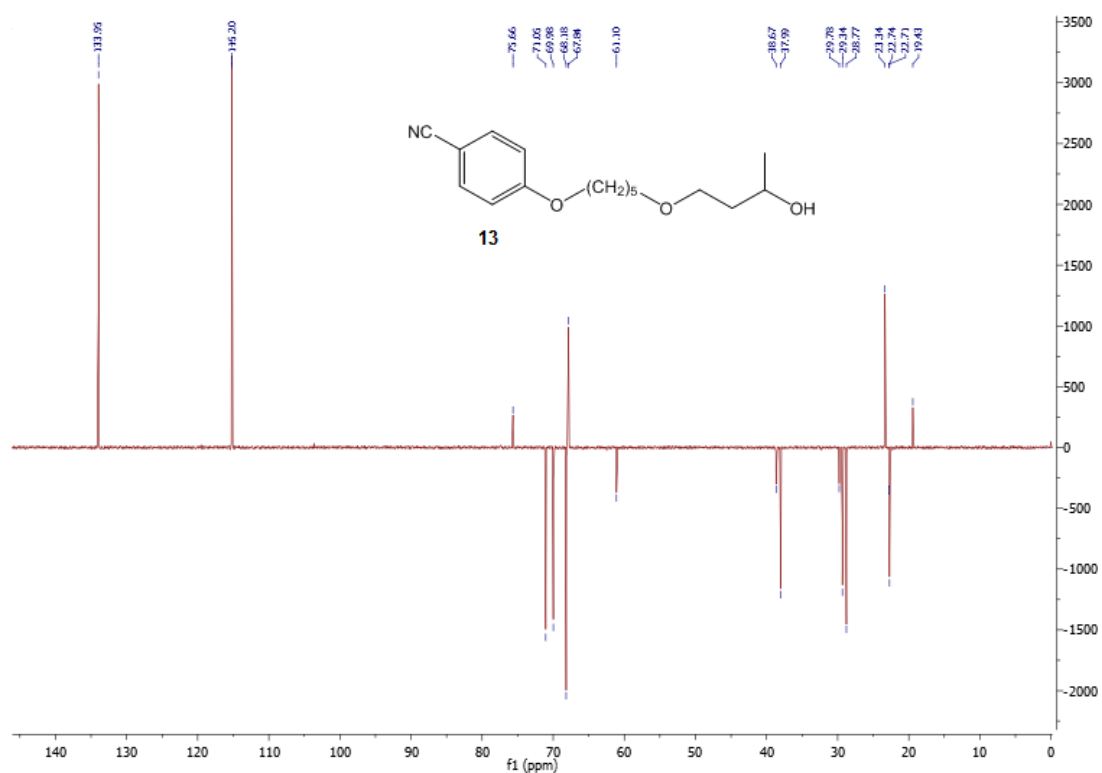


Figura 5.39: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

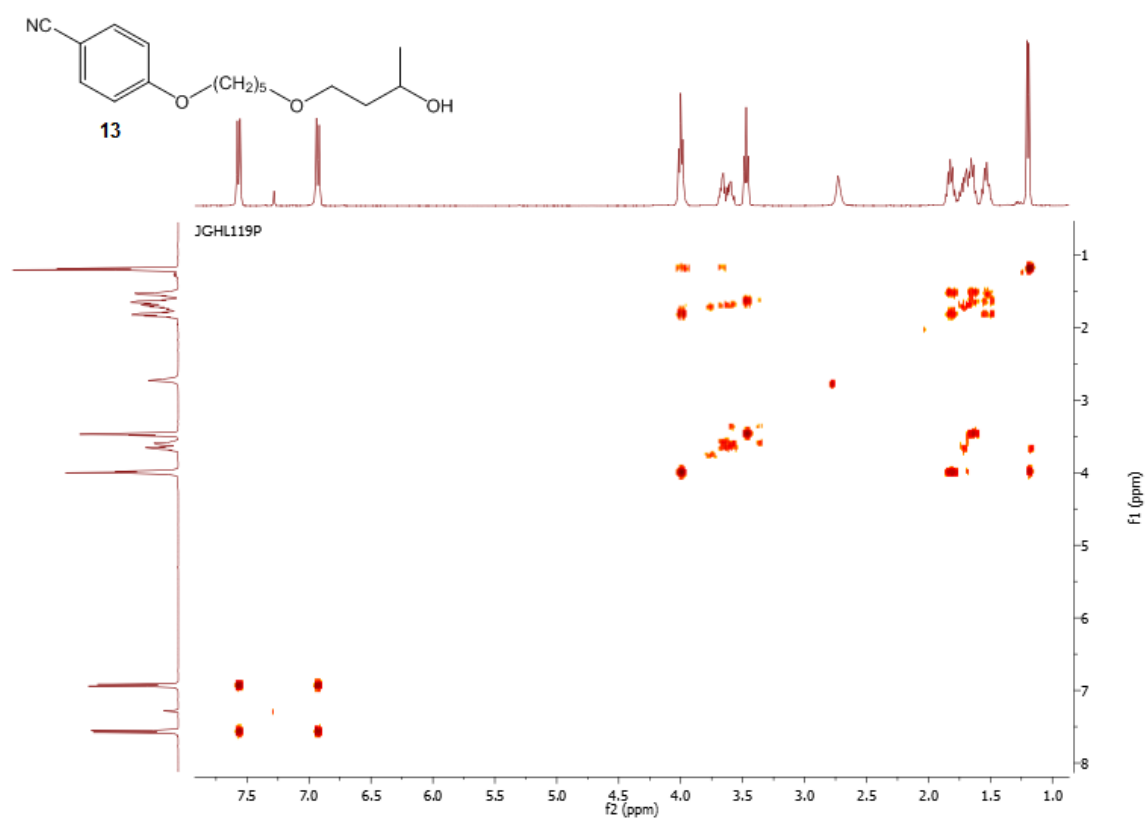


Figura 5.40: Espectro de COSY (CDCl₃) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

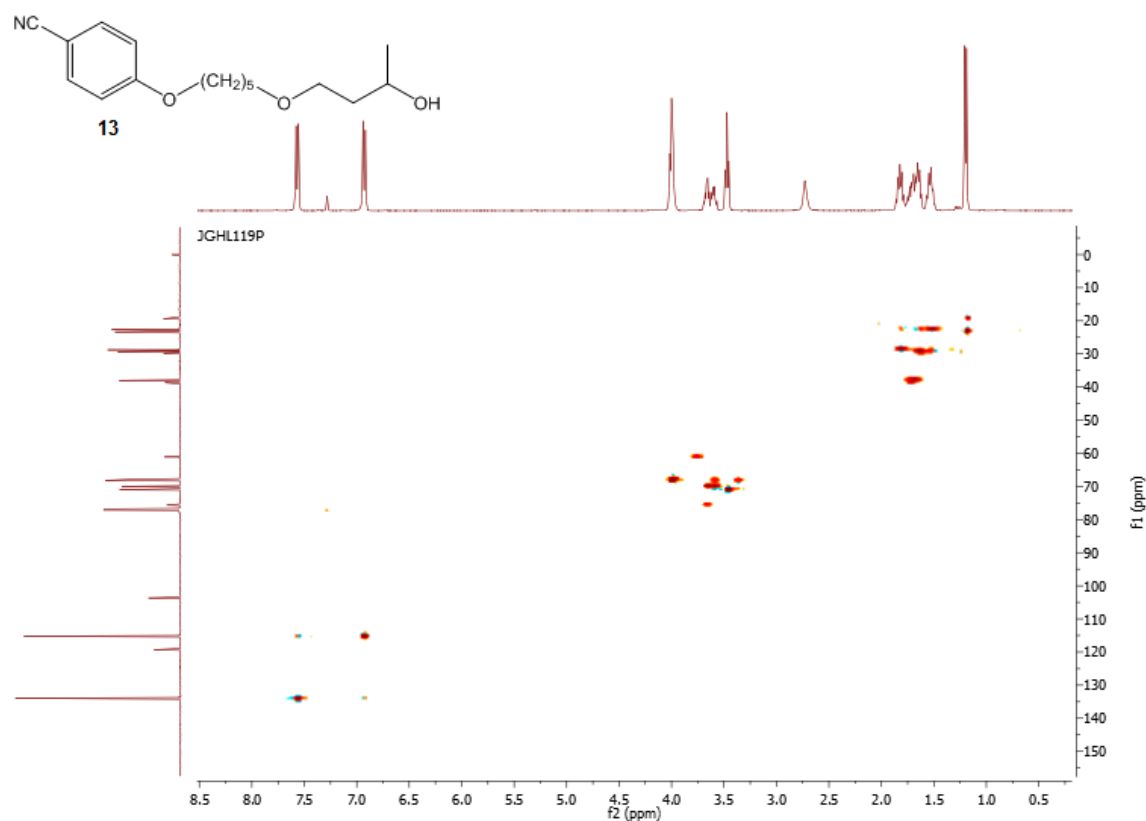


Figura 5.41: Espectro de HMQC (CDCl₃) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

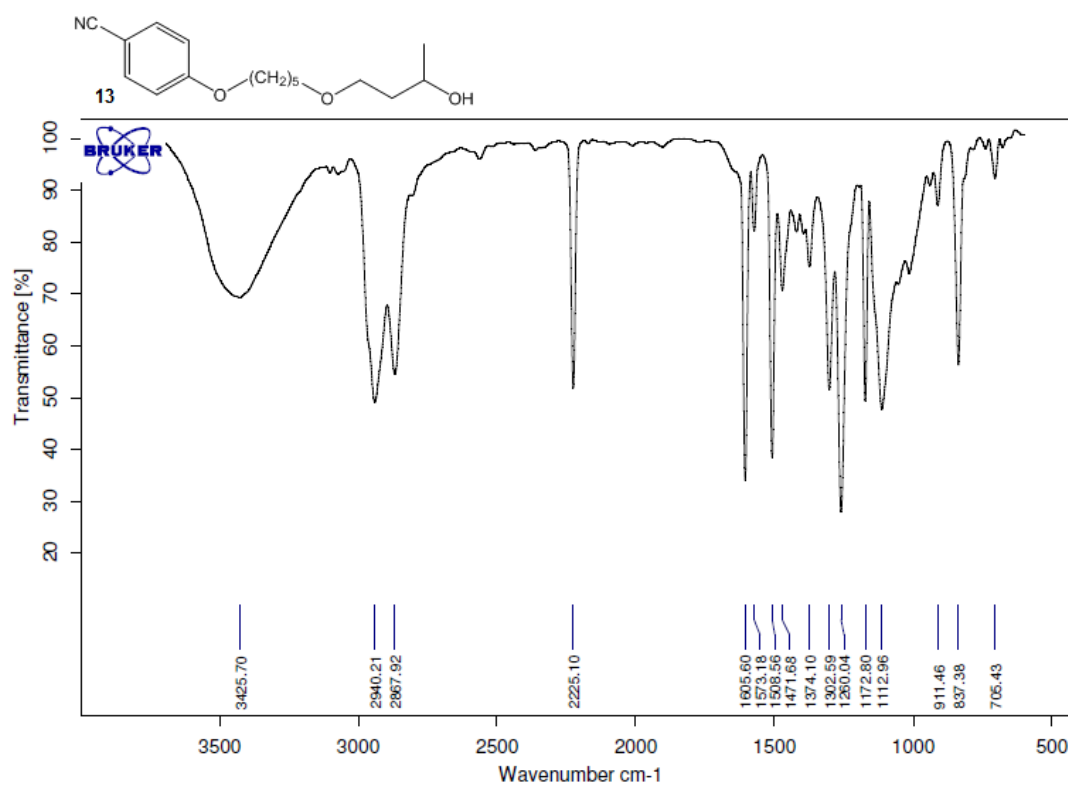


Figura 5.42: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-((3-hidroxibutoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **13**.

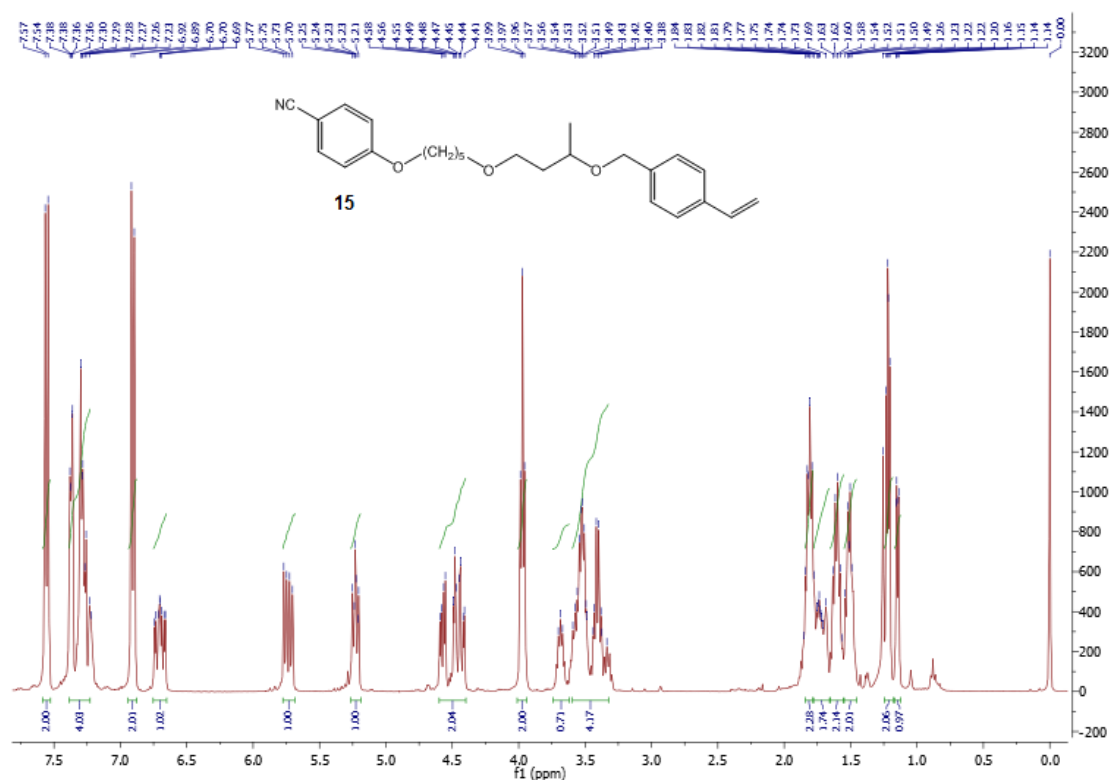


Figura 5.43: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

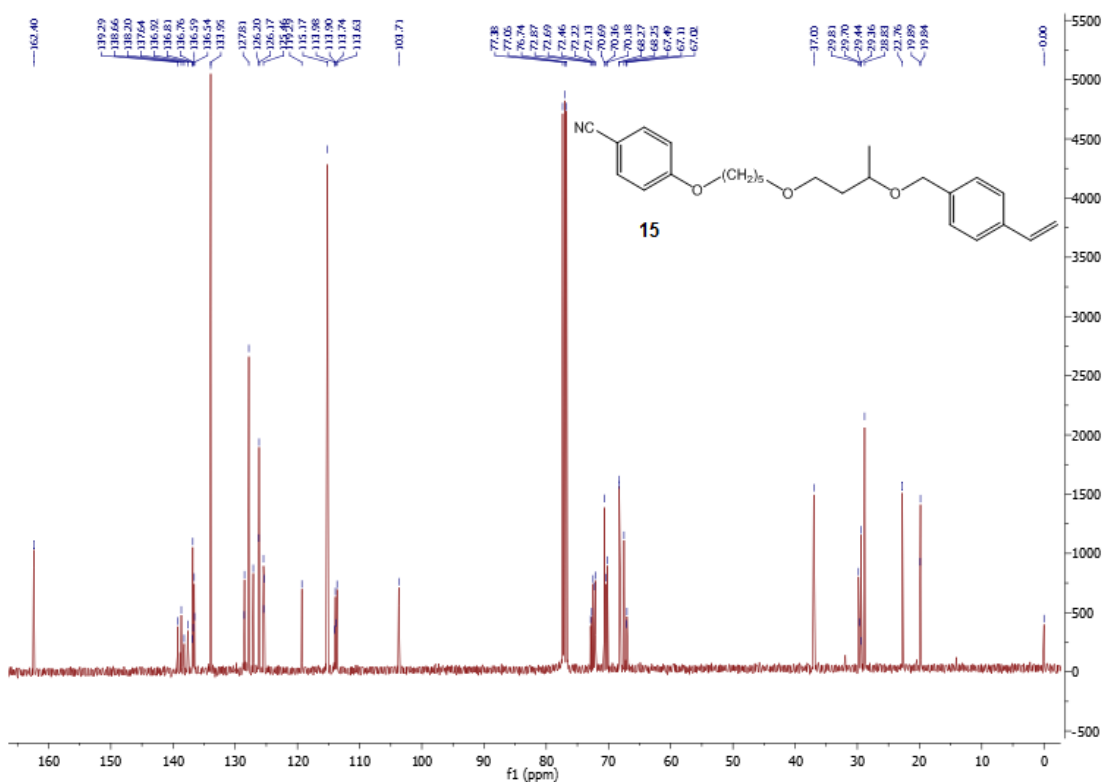


Figura 5.44: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

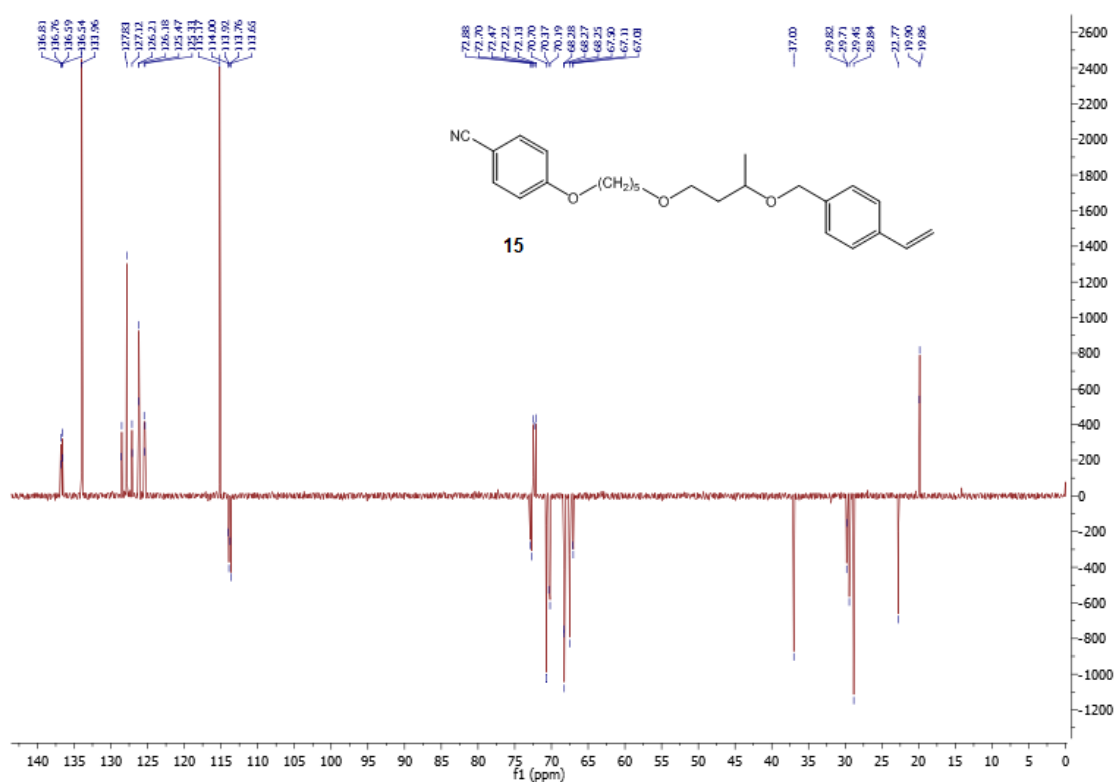


Figura 5.45: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

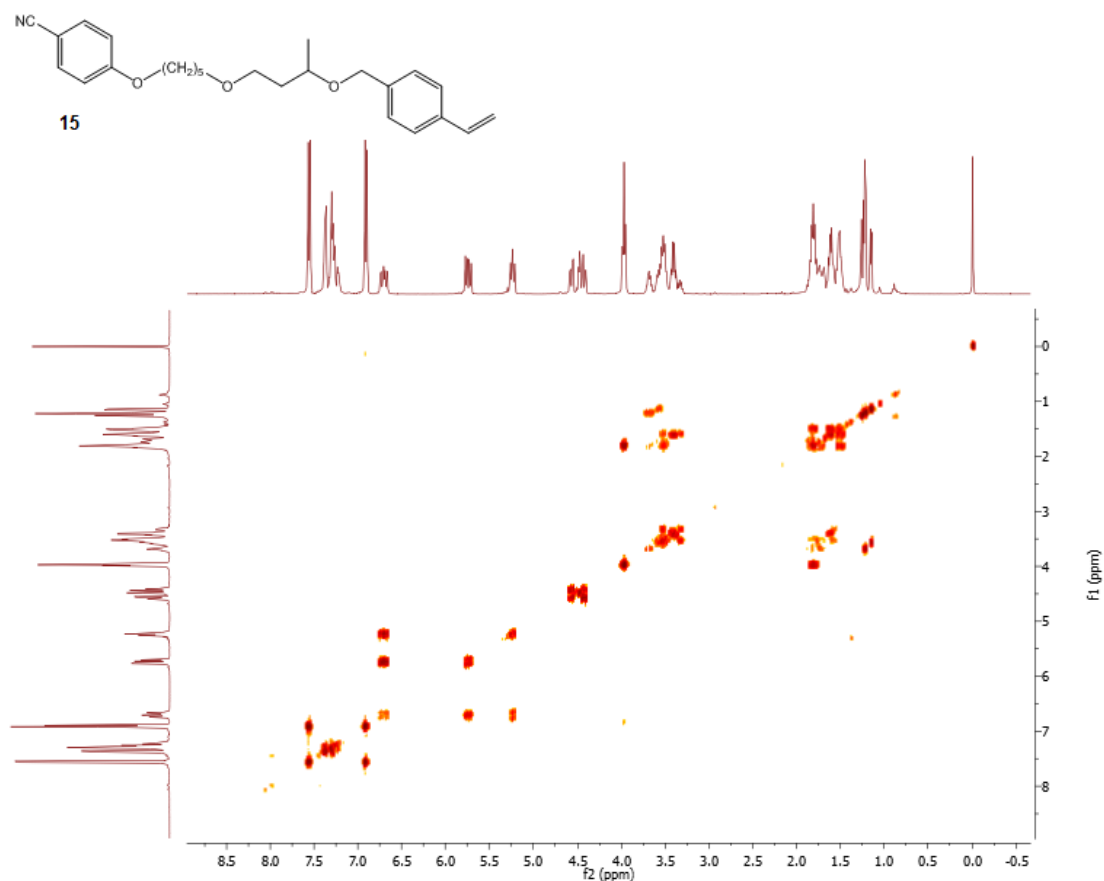


Figura 5.46: Espectro de COSY (CDCl_3) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

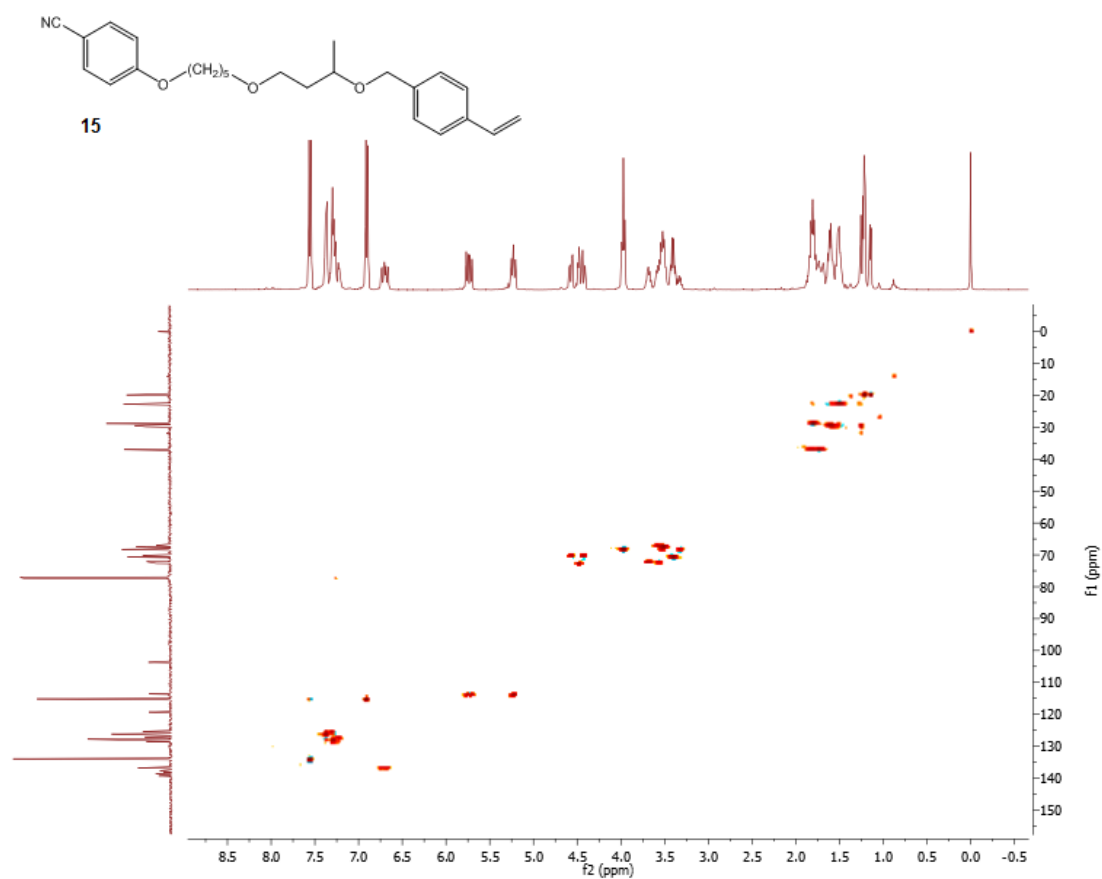


Figura 5.47: Espectro de HMQC (CDCl₃) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

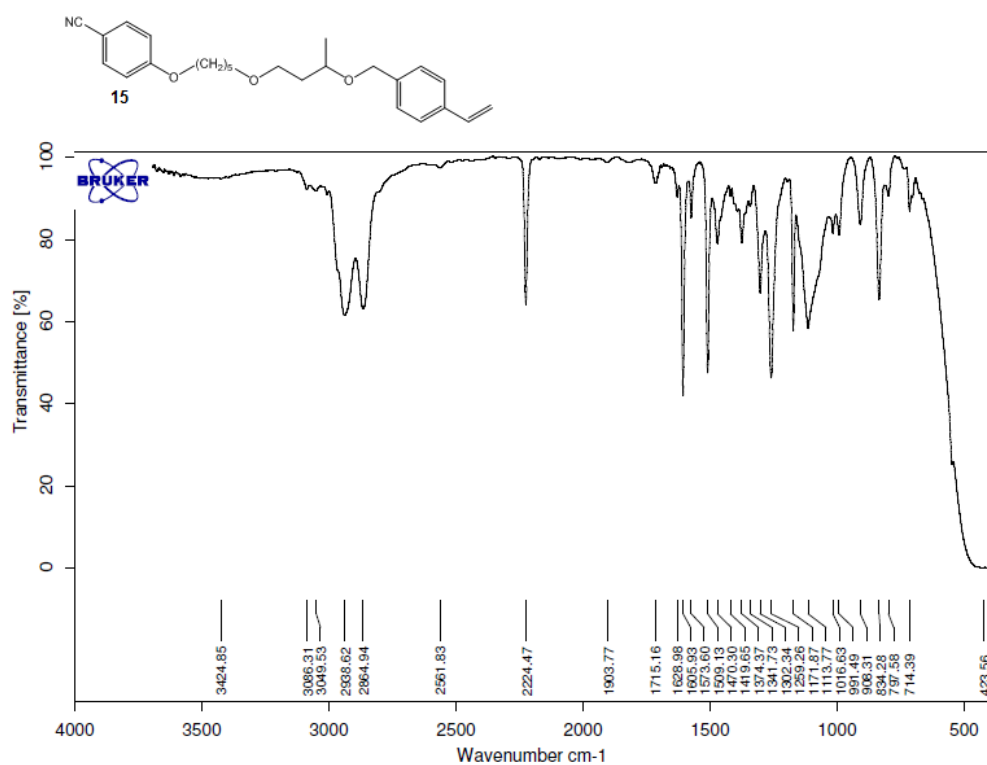


Figura 5.48: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-((5-(3-((4-vinilbenzil)oxi)butoxi)pentil)oxi)benzonitrilo, **15**.

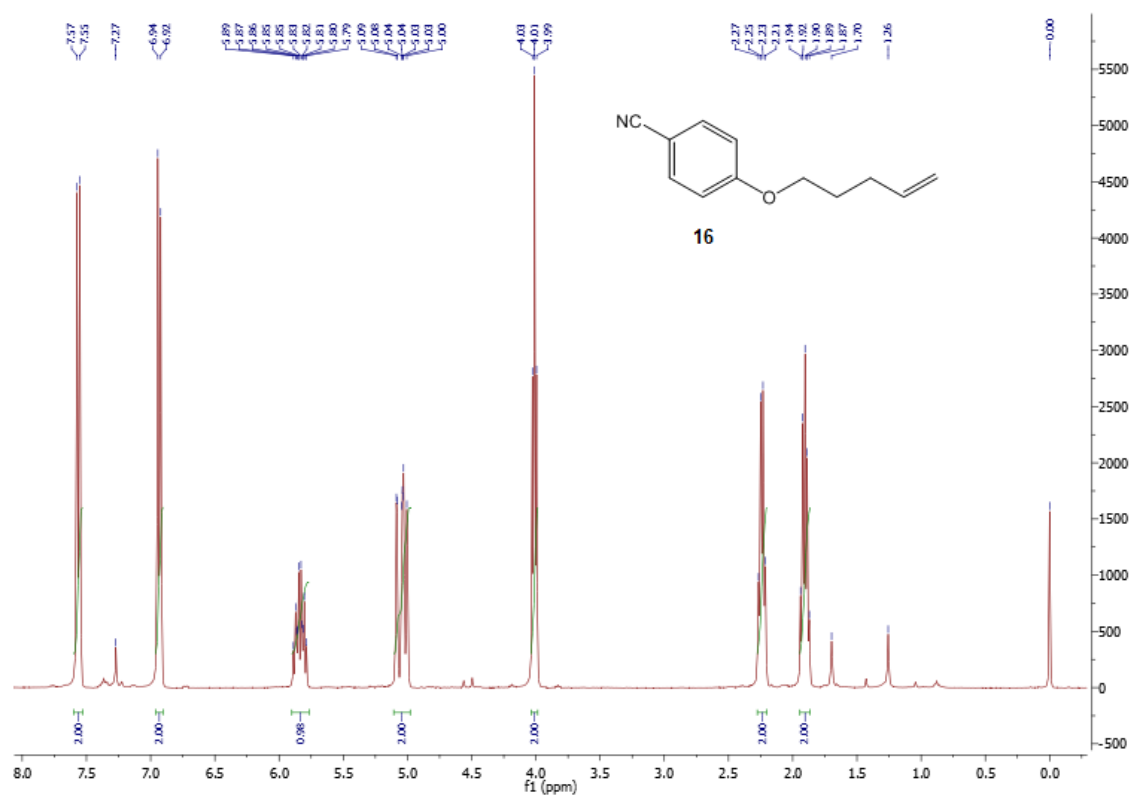


Figura 5.49: Espectro de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) do 4-(pente-4-en-1-iloxy)benzonitrilo, **16**.

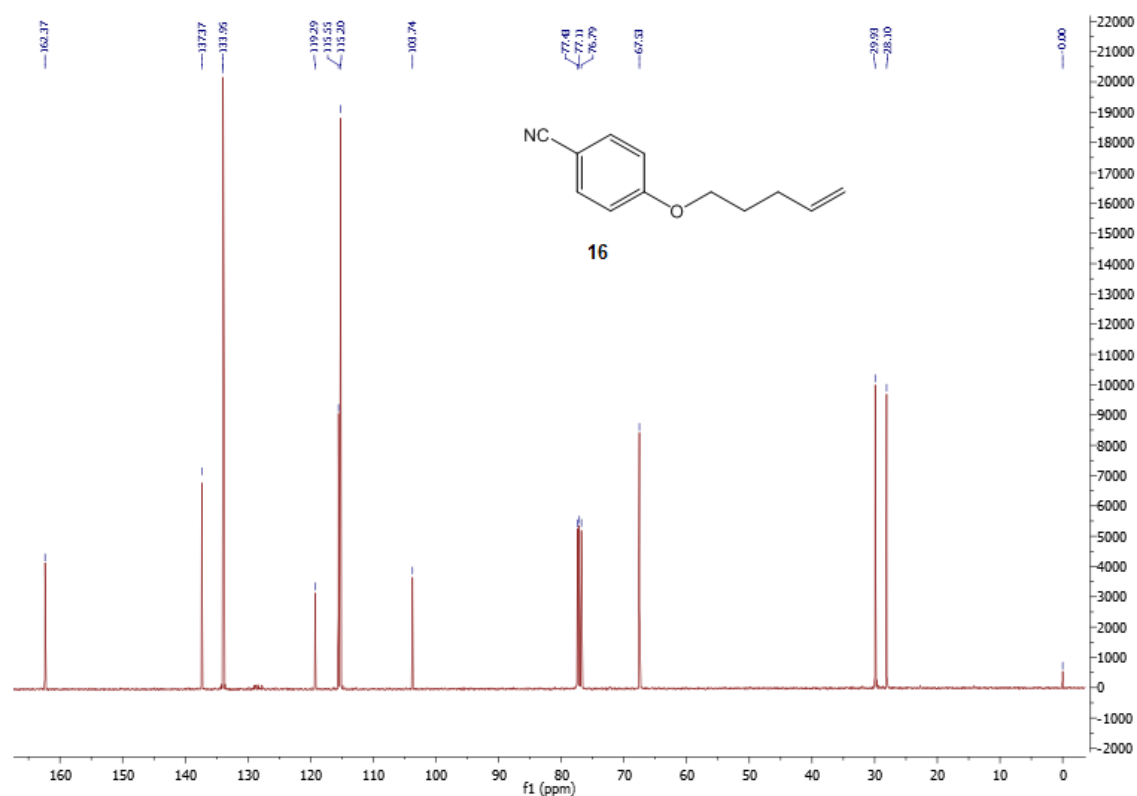


Figura 5.50: Espectro de ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) do 4-(pente-4-en-1-iloxy)benzonitrilo, **16**.

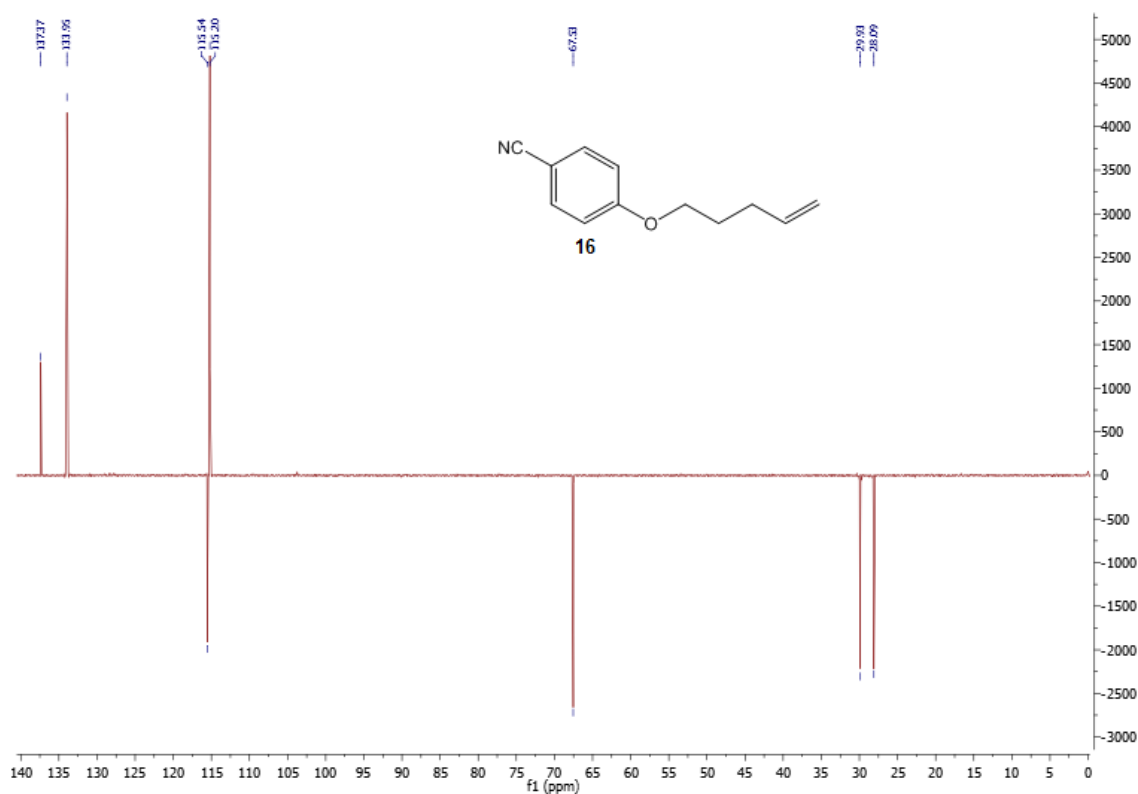


Figura 5.51: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, **16**.

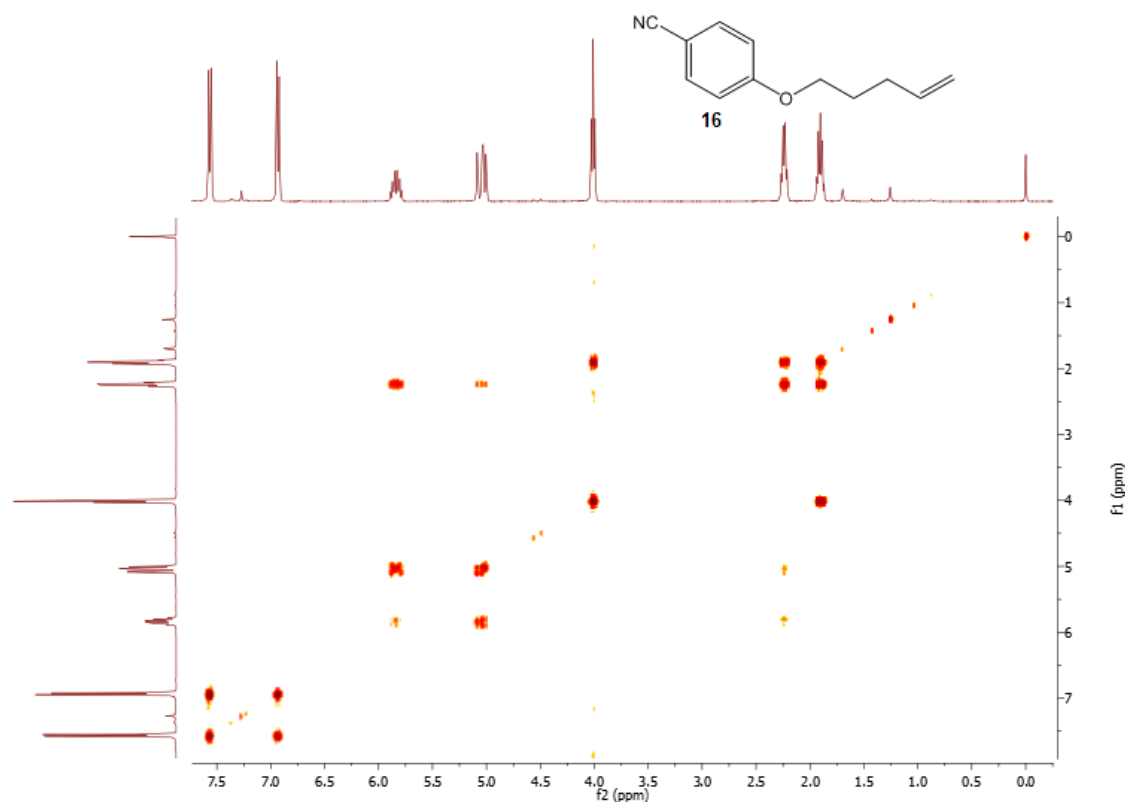


Figura 5.52: Espectro de COSY (CDCl₃) do 4-(pente-4-en-1-iloxi)benzonitrilo, **16**.

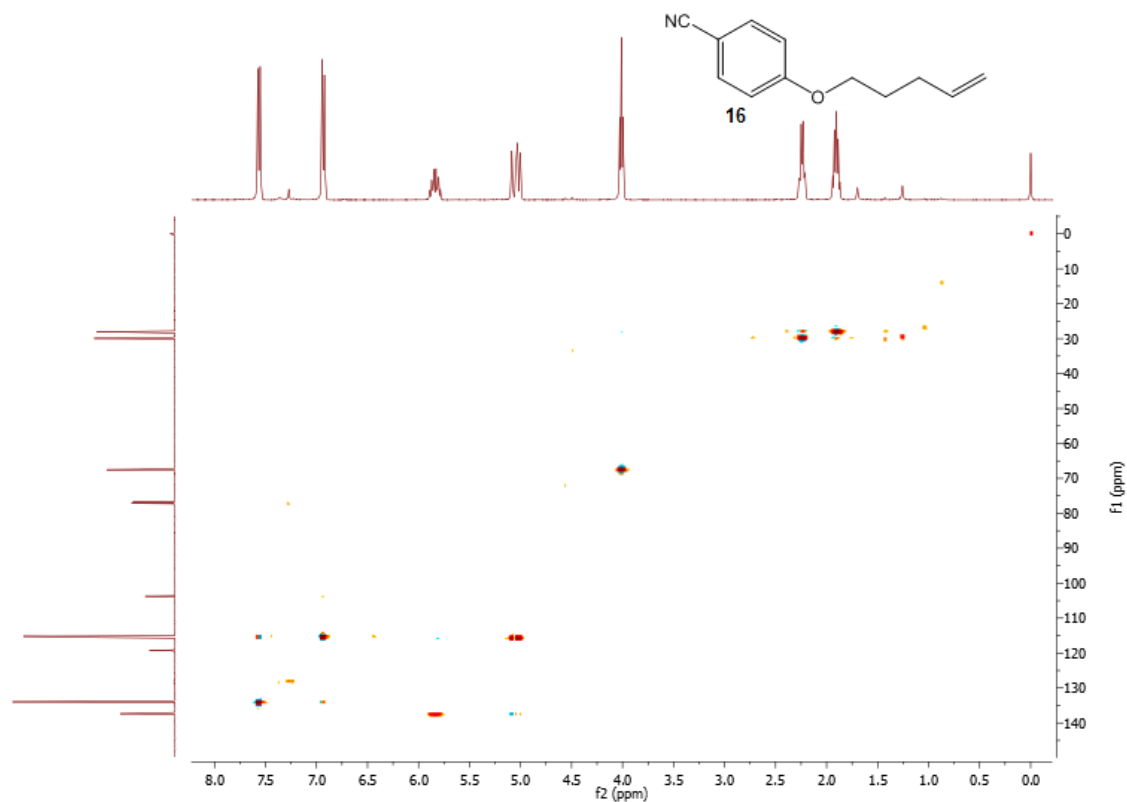


Figura 5.53: Espectro de HMQC (CDCl₃) do 4-(pente-4-en-1-iloxy)benzonitrilo, **16**.

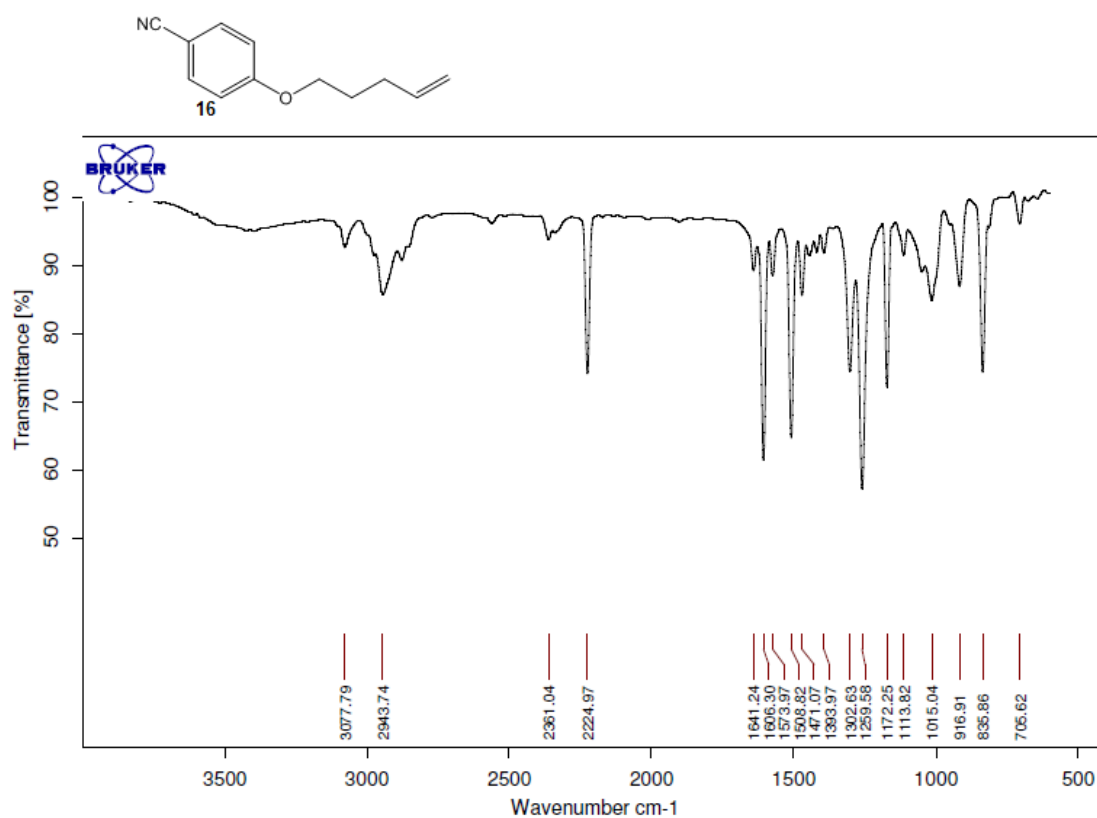


Figura 5.54: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-(pente-4-en-1-iloxy)benzonitrilo, **16**.

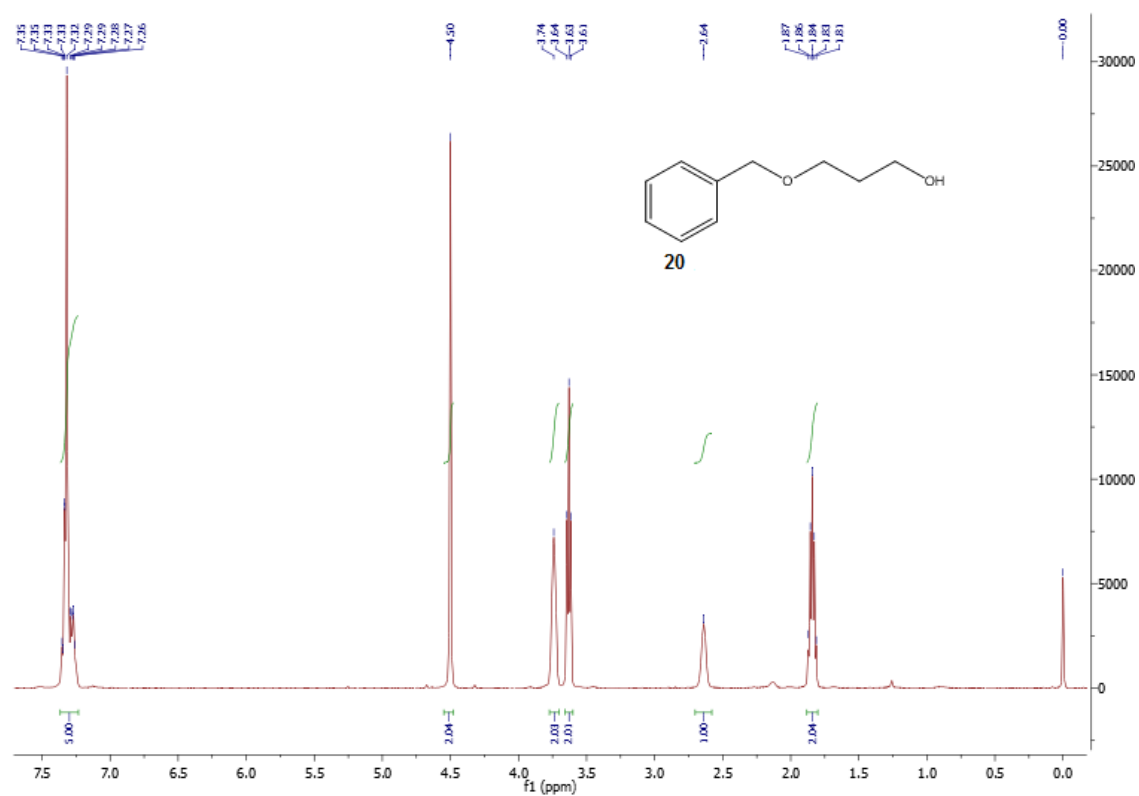


Figura 5.55: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.

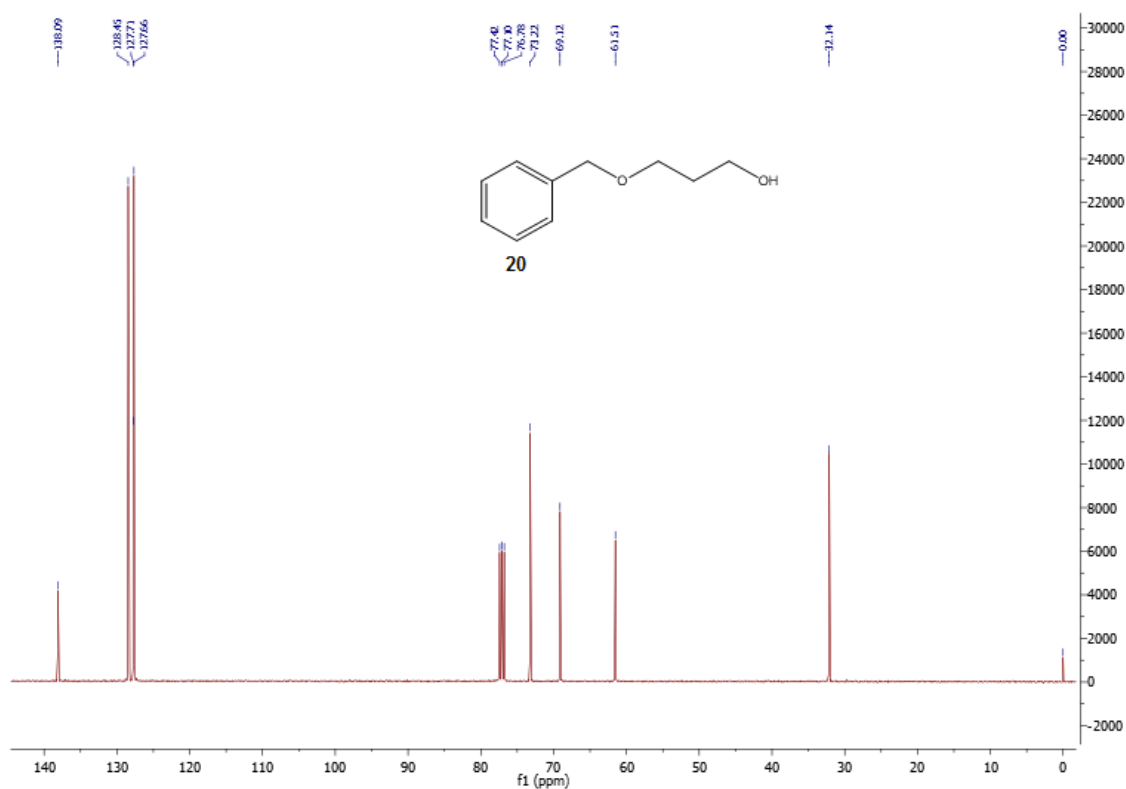


Figura 5.56: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.

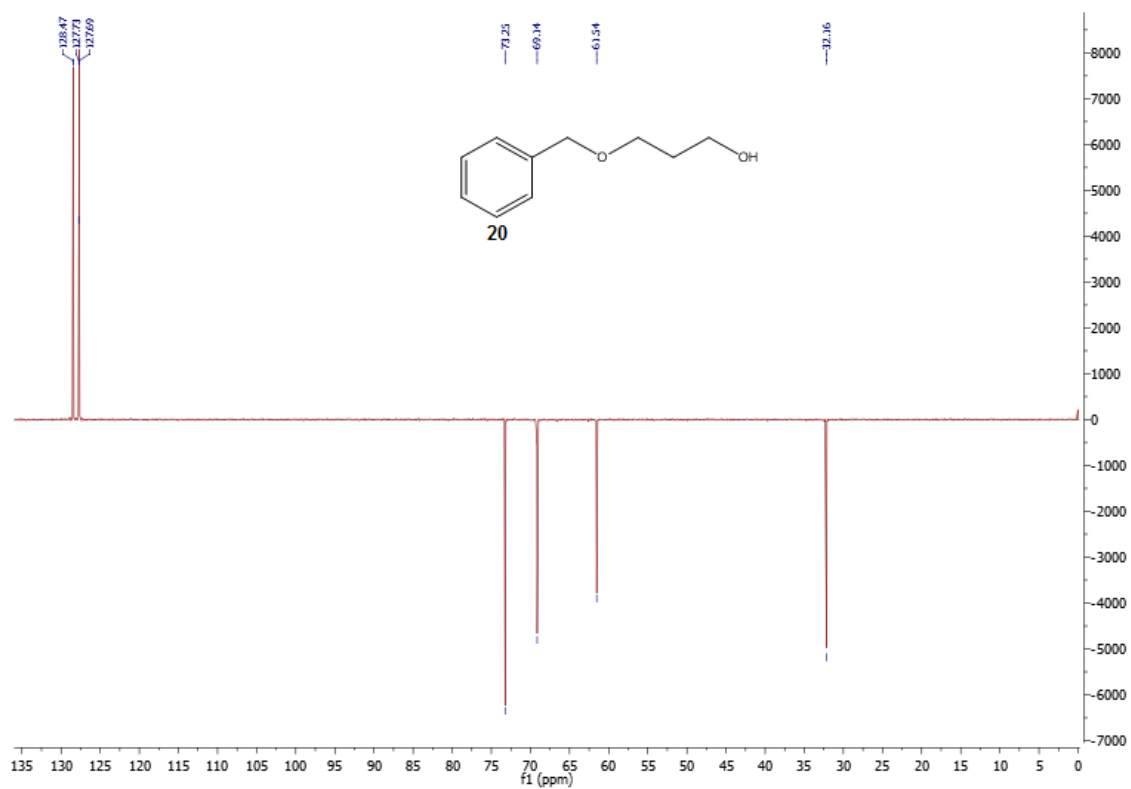


Figura 5.57: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.

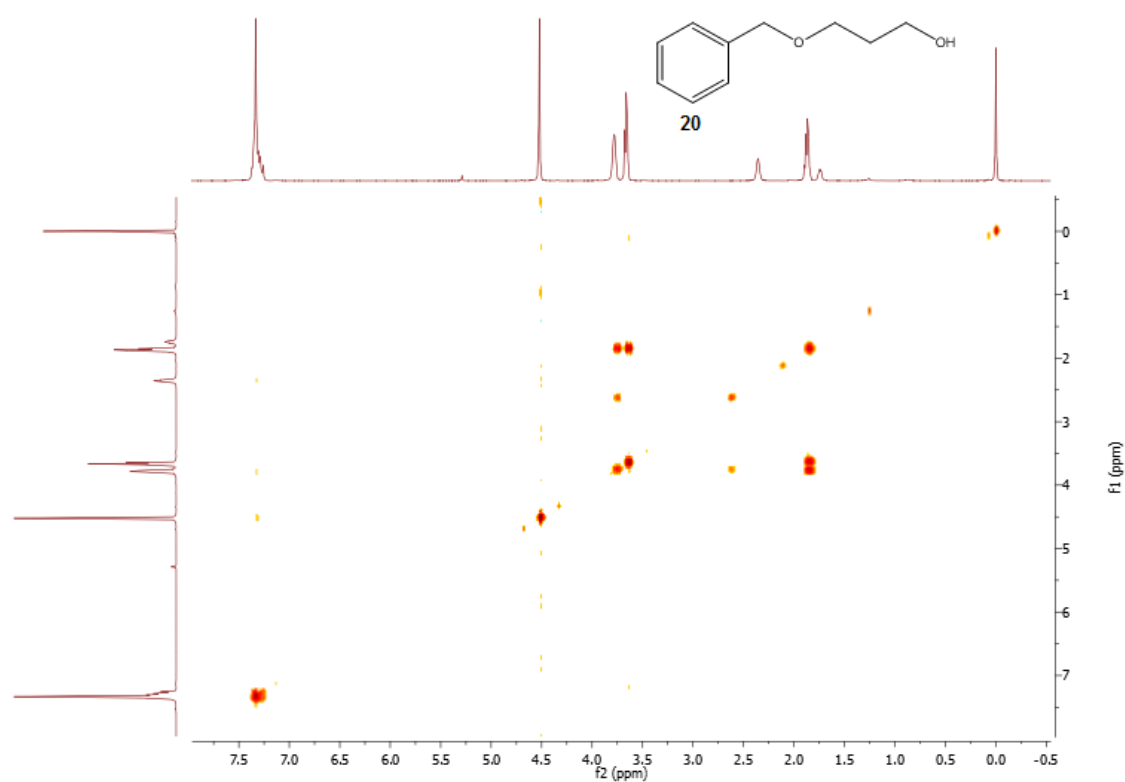
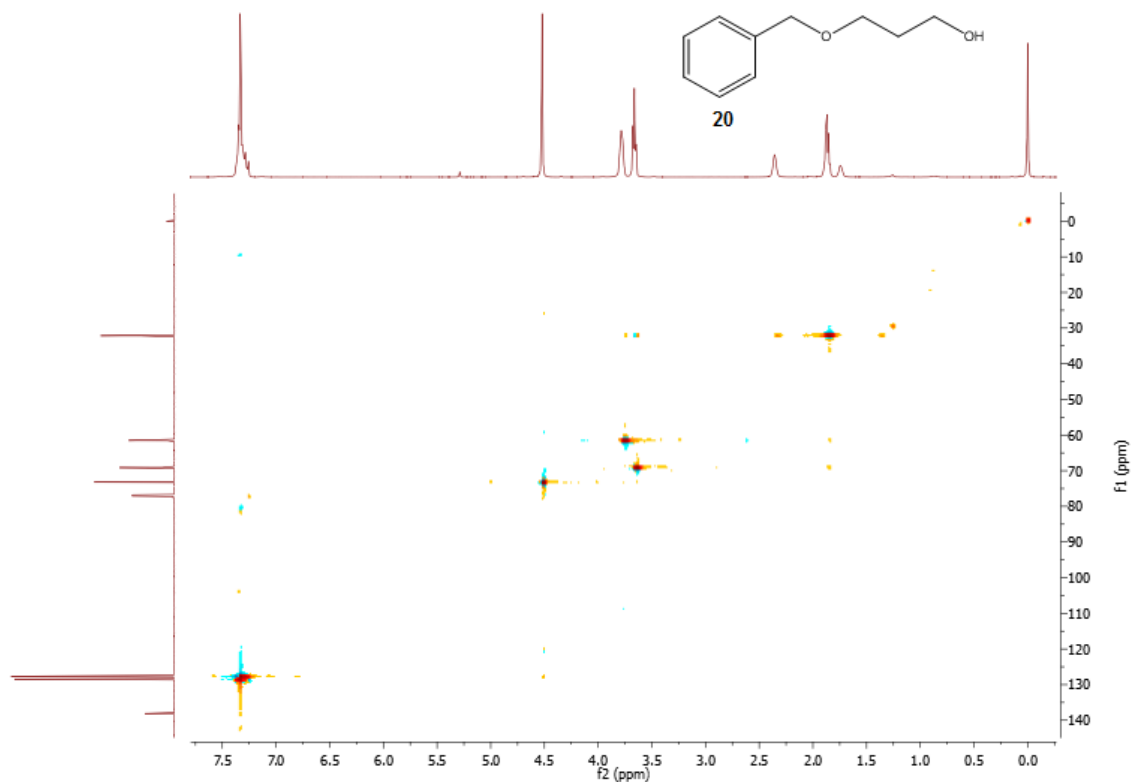
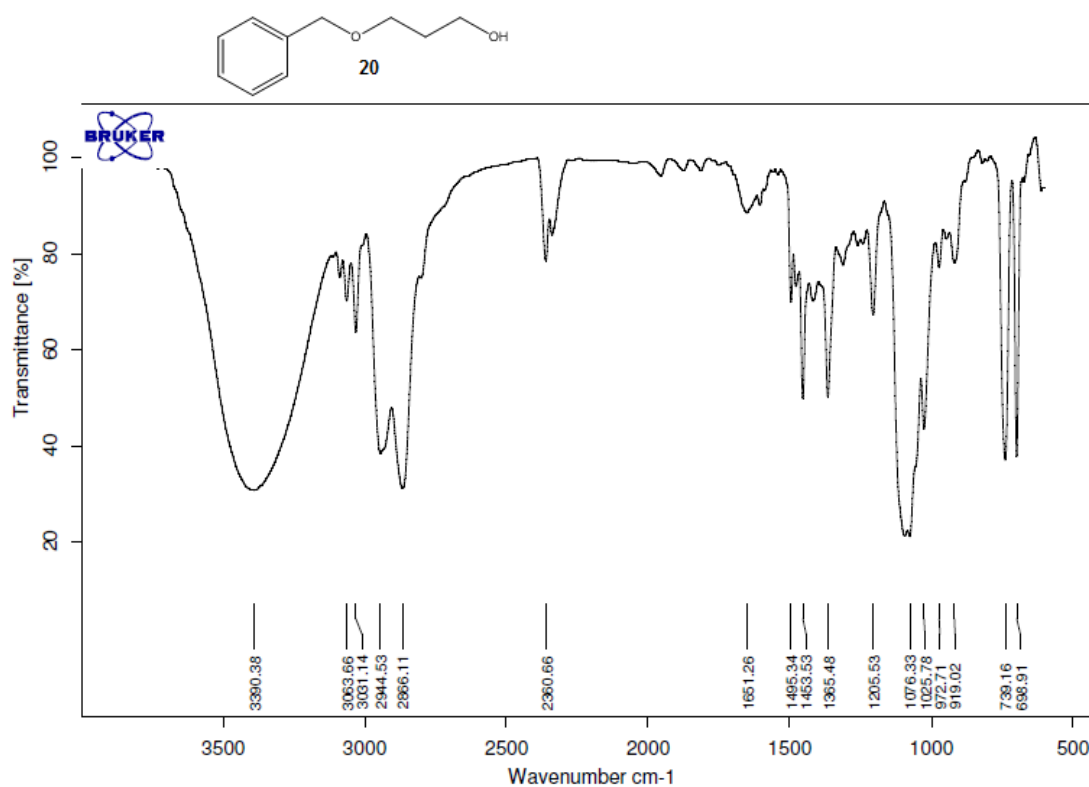


Figura 5.58: Espectro de COSY (CDCl₃) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.

Figura 5.59: Espectro de HMQC (CDCl₃) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.Figura 5.60: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-(benziloxy)propan-1-ol, **20**.

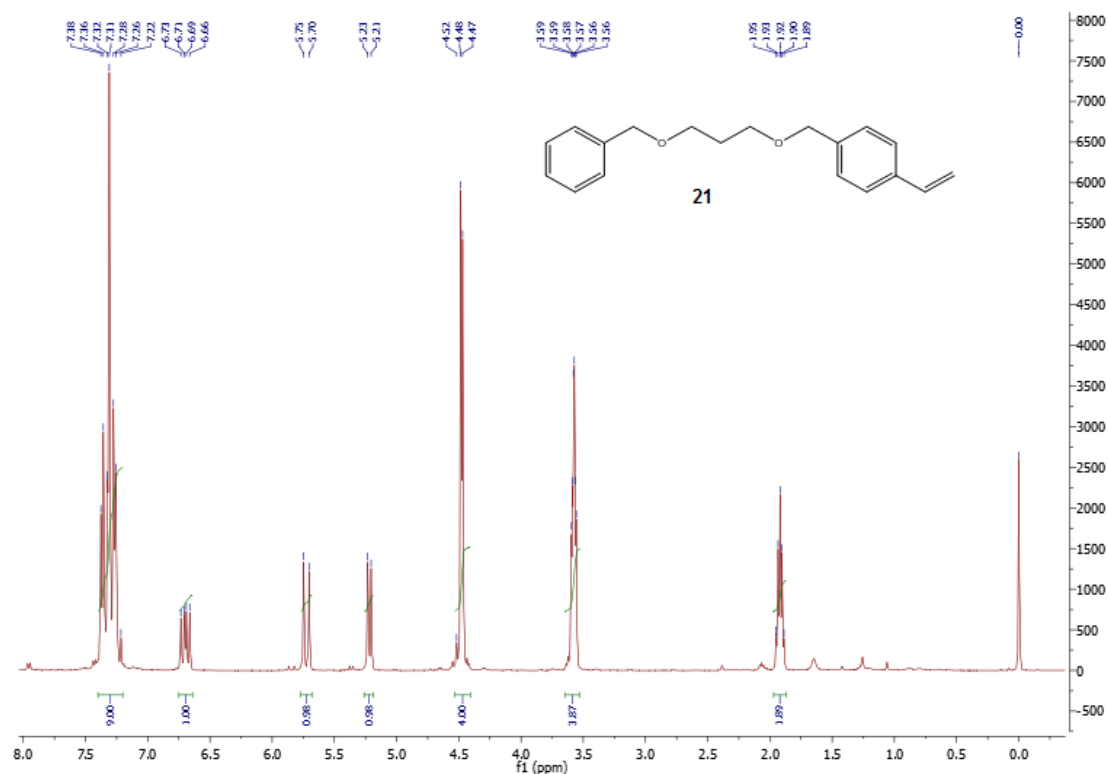


Figura 5.61: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzoxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

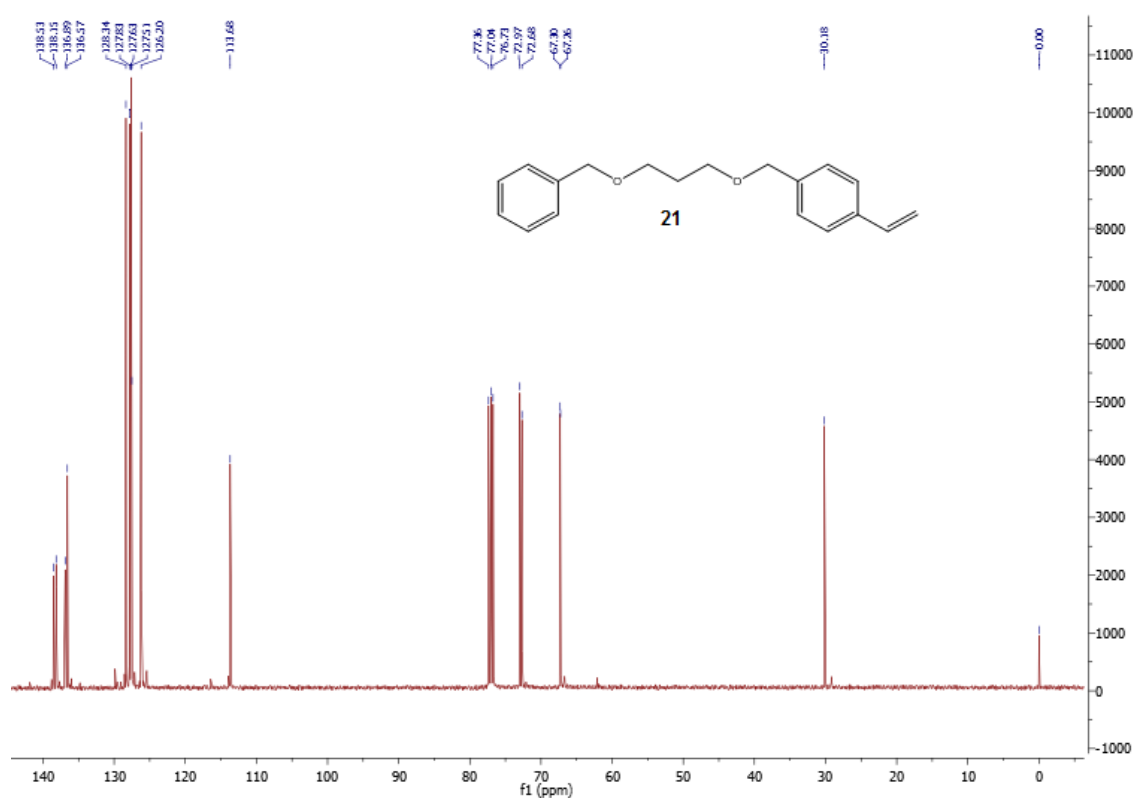


Figura 5.62: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzoxi)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

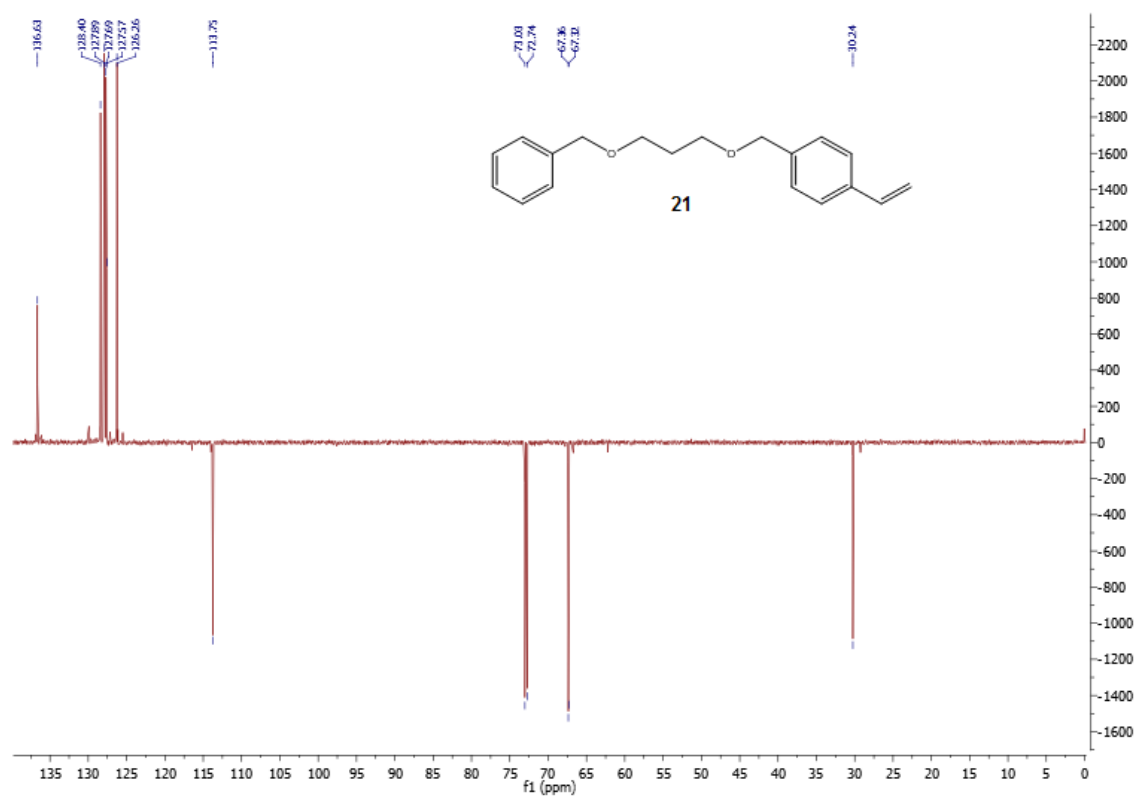


Figura 5.63: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl_3) do 1-((3-(benzeloxy)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

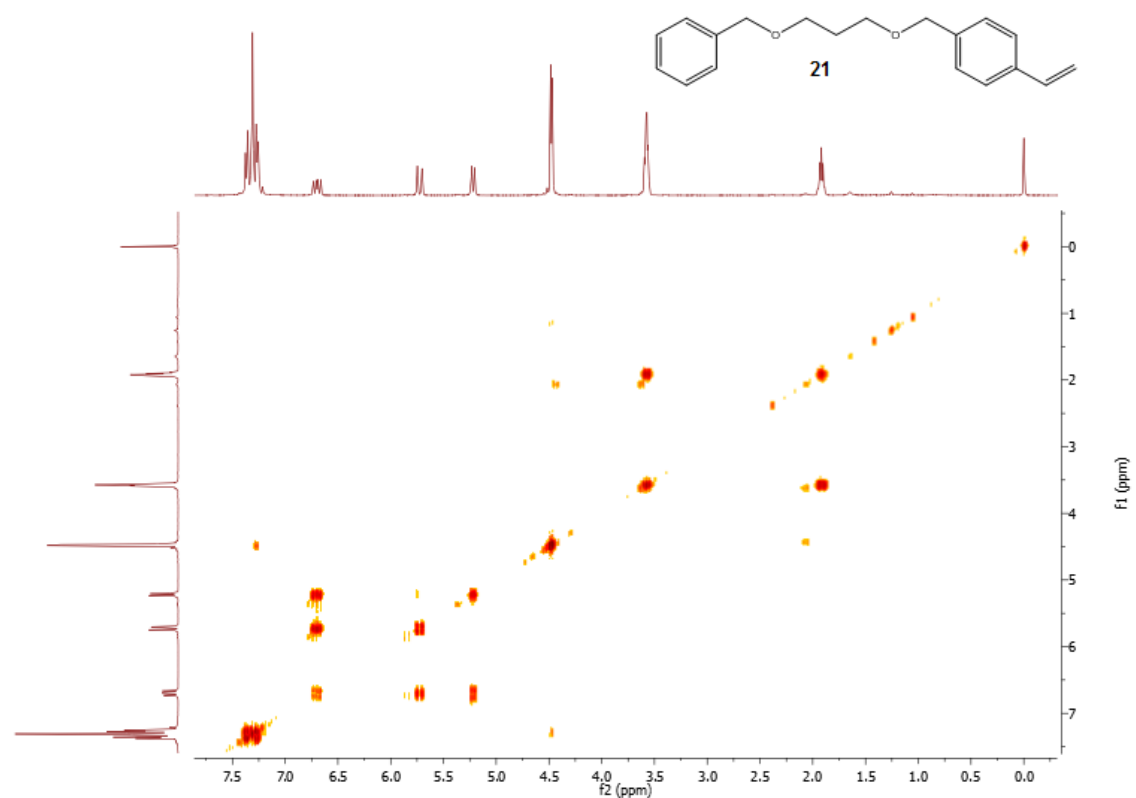
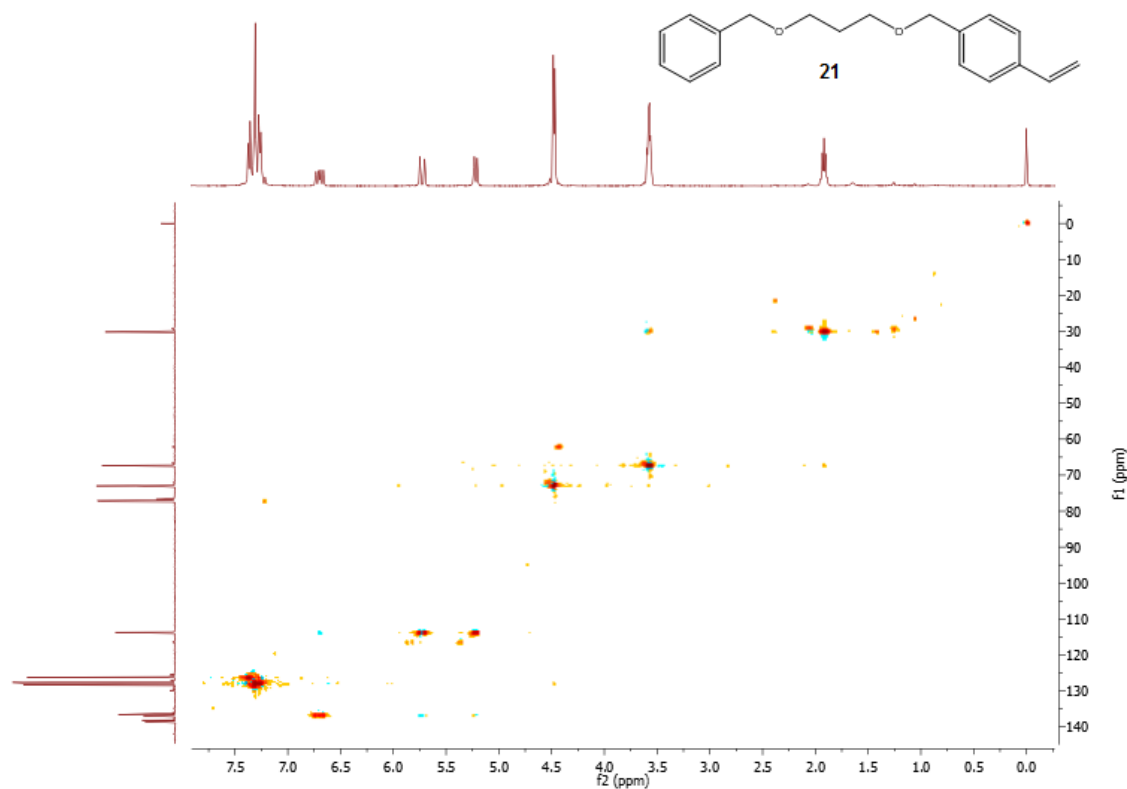
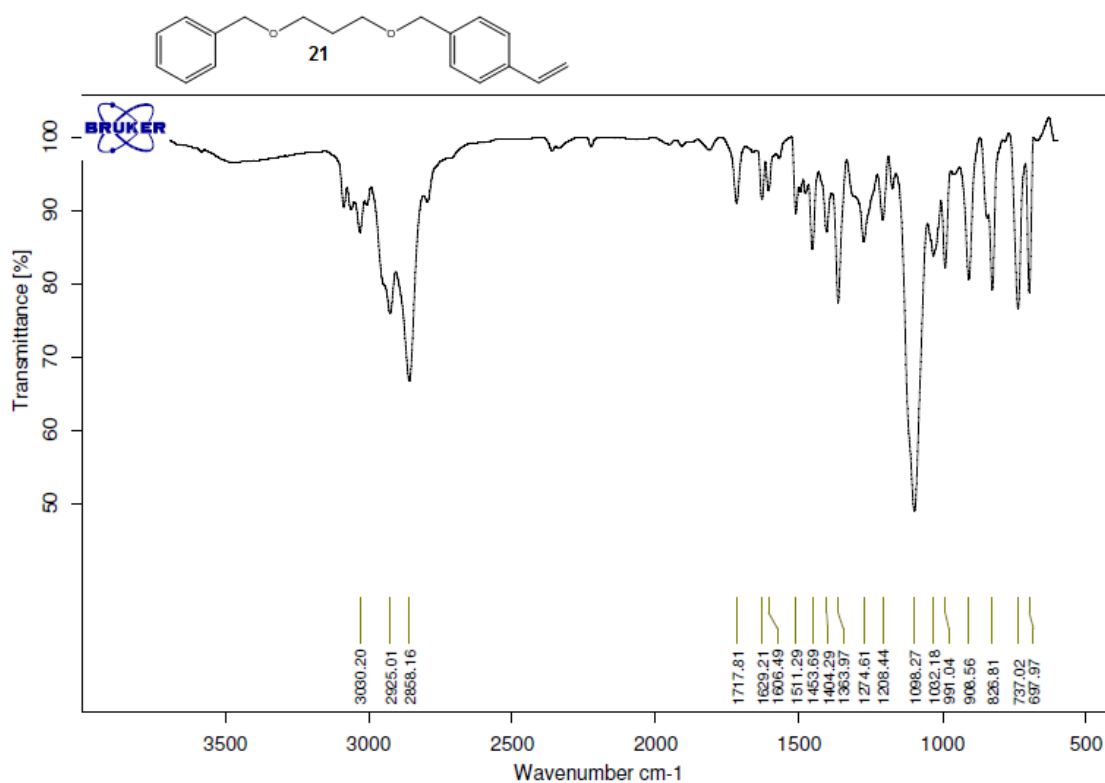


Figura 5.64: Espectro de COSY (CDCl_3) do 1-((3-(benzeloxy)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

Figura 5.65: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 1-((3-(benzeloxy)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.Figura 5.66: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-((3-(benzeloxy)propoxi)metil)-4-vinilbenzeno, **21**.

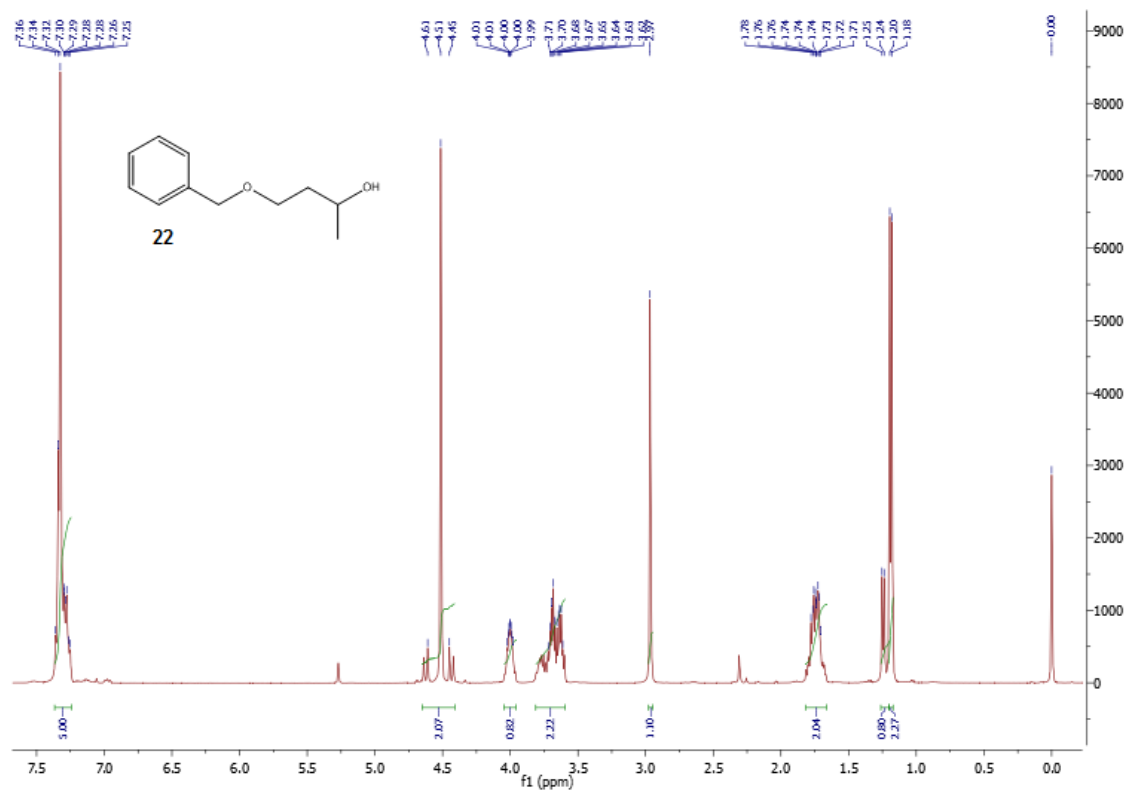
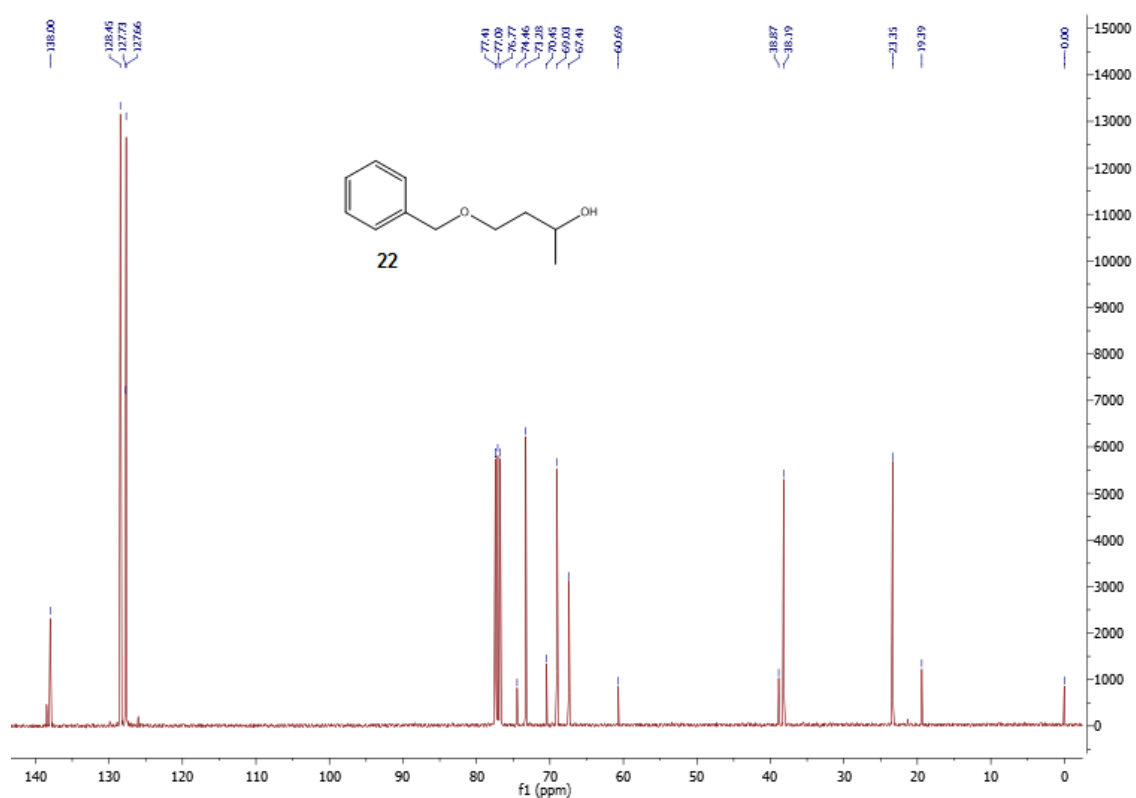
Figura 5.67: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.Figura 5.68: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.



Figura 5.69: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.

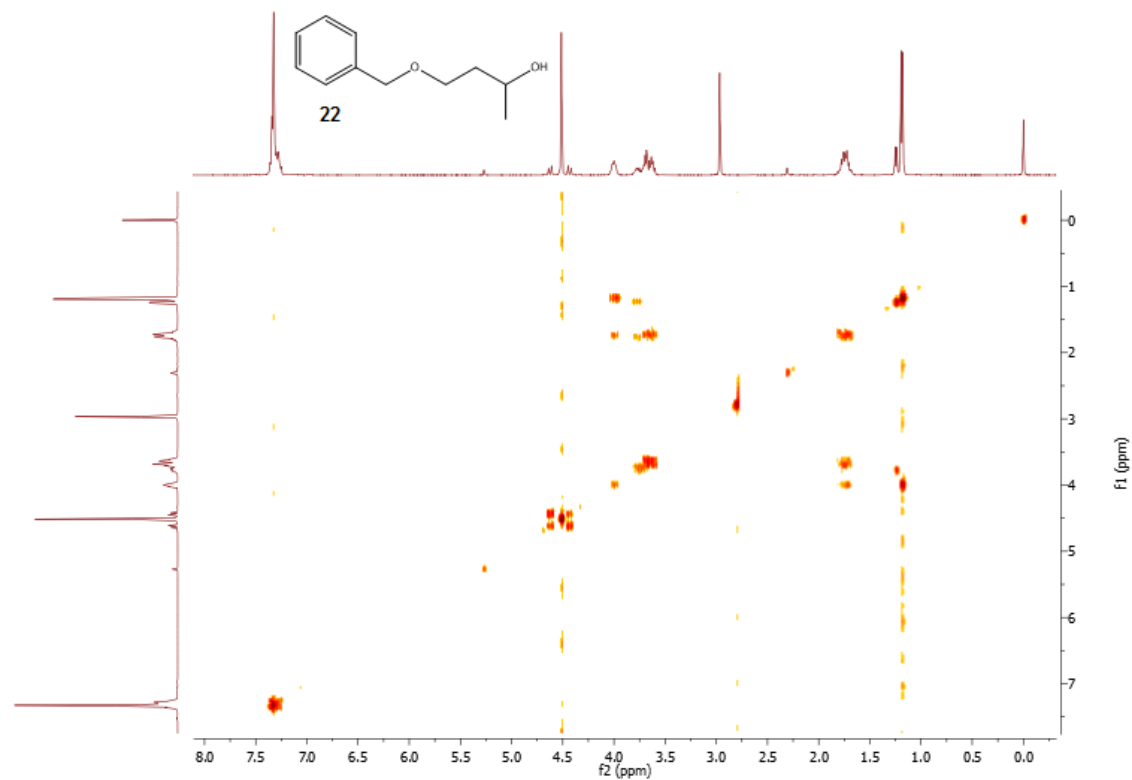


Figura 5.70: Espectro de COSY (CDCl₃) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.

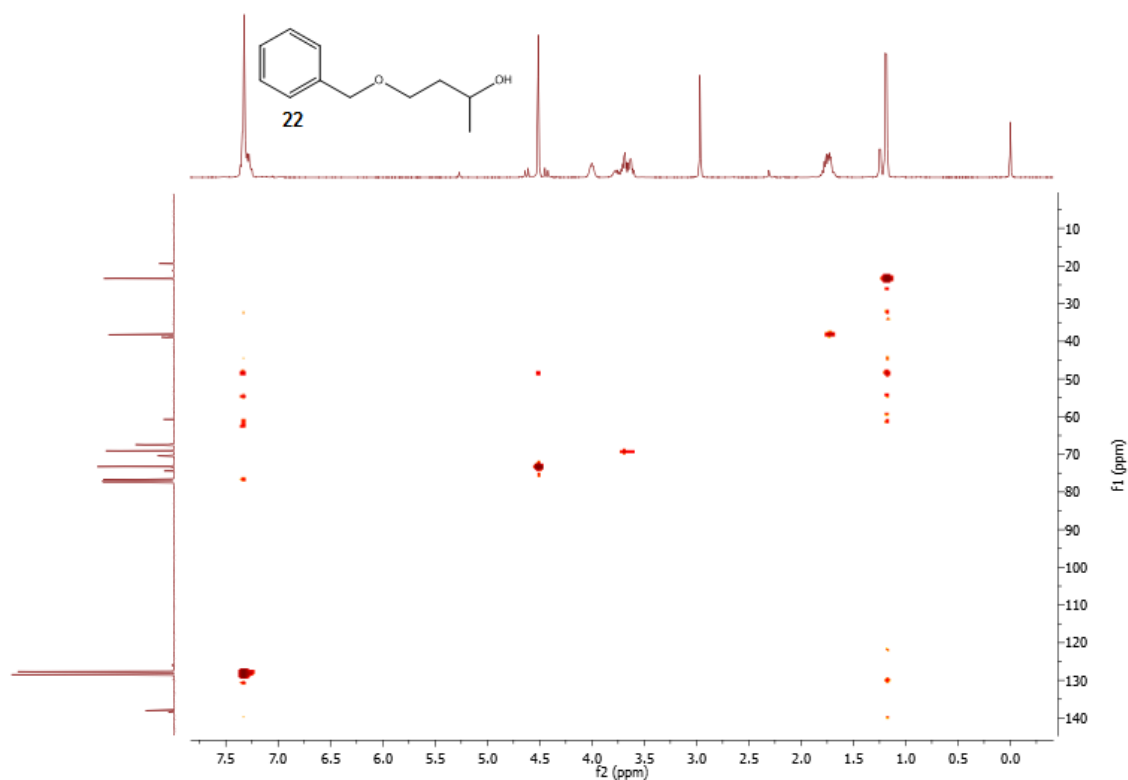


Figura 5.71: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.

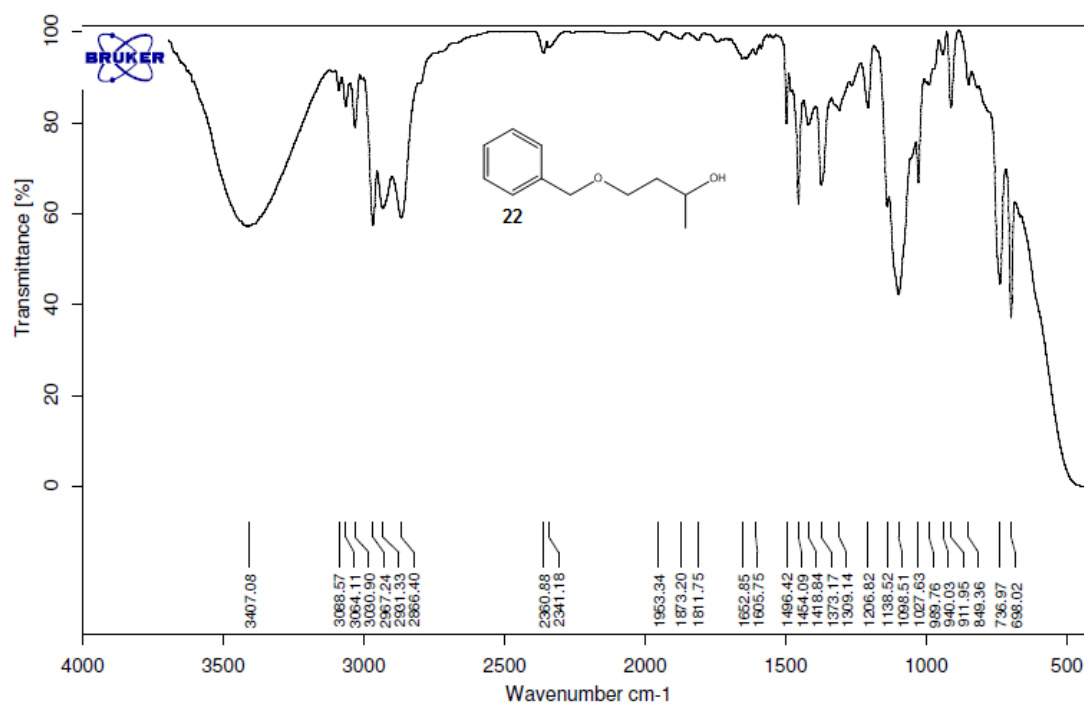


Figura 5.72: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 4-(benziloxy)butan-2-ol, **22**.

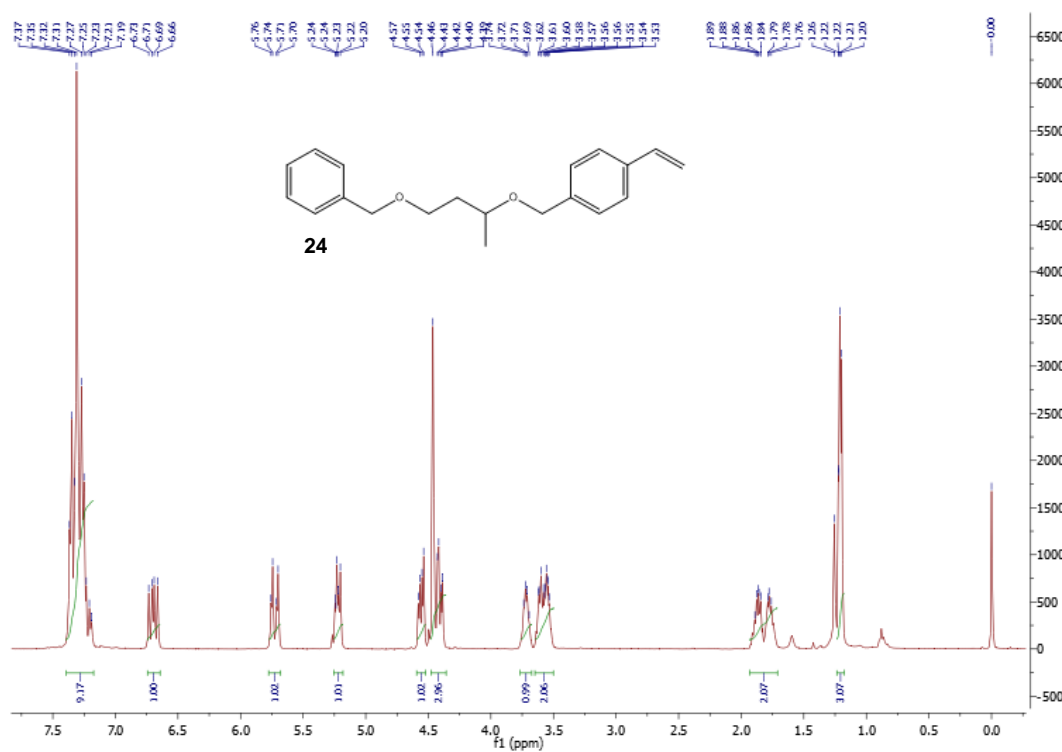


Figura 5.73: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzo, **24**.

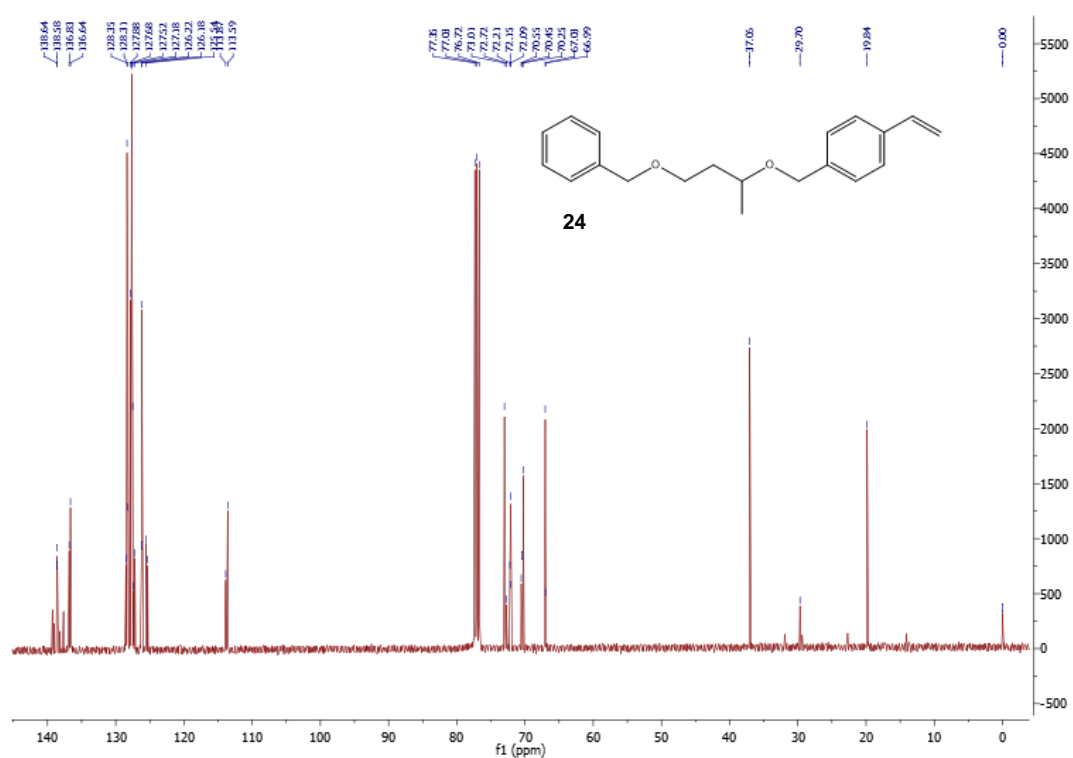


Figura 5.74: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzo, **24**.

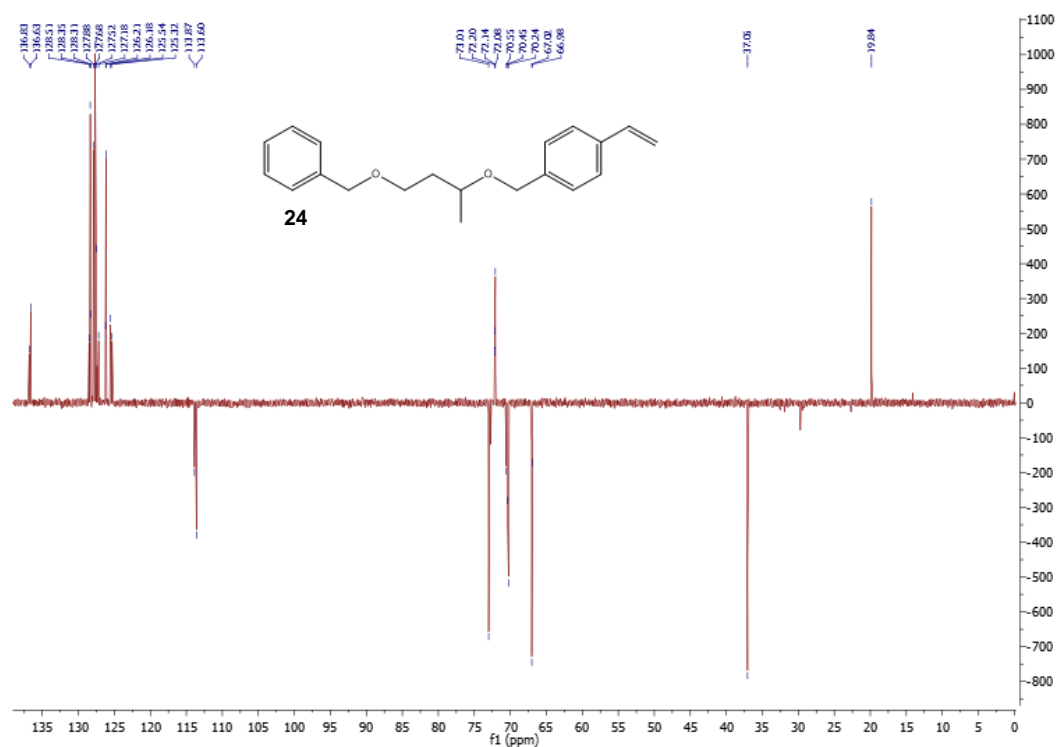


Figura 5.75: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **24**.

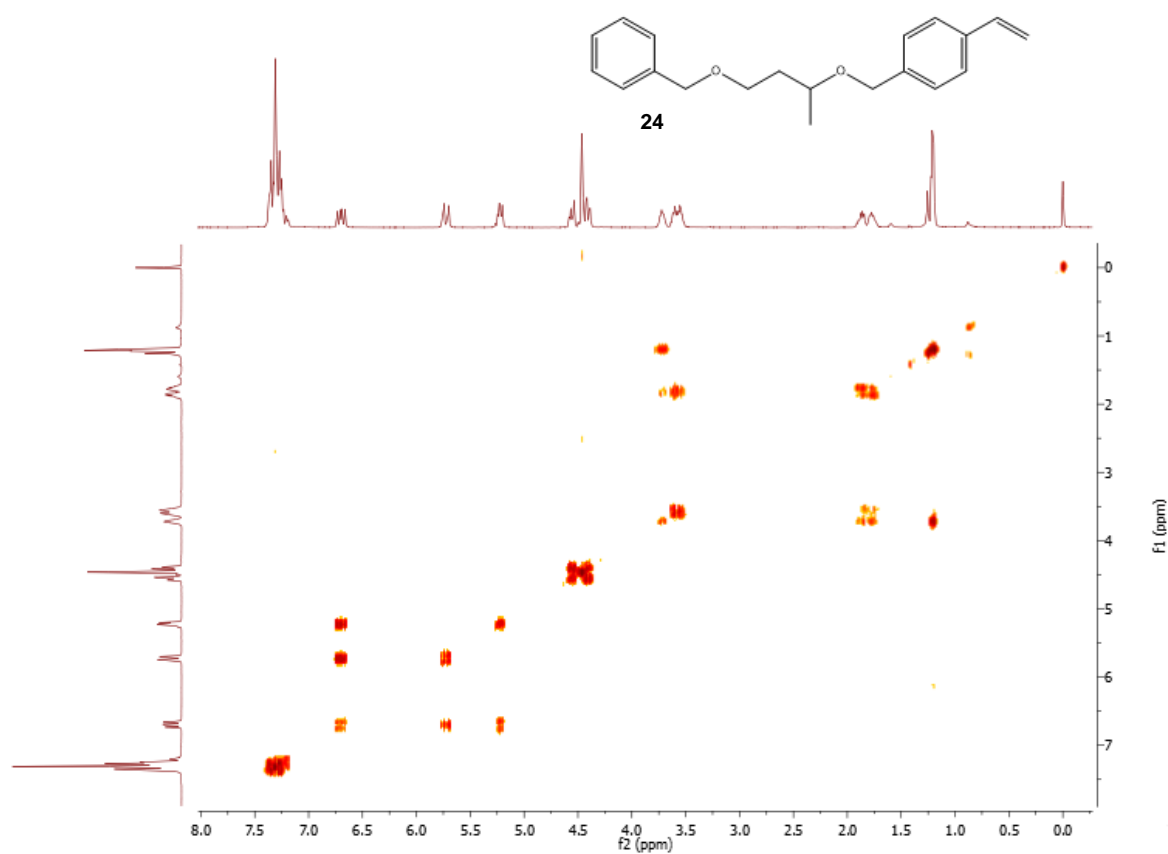


Figura 5.76: Espectro de COSY (CDCl₃) do 1-(((4-(benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **24**.

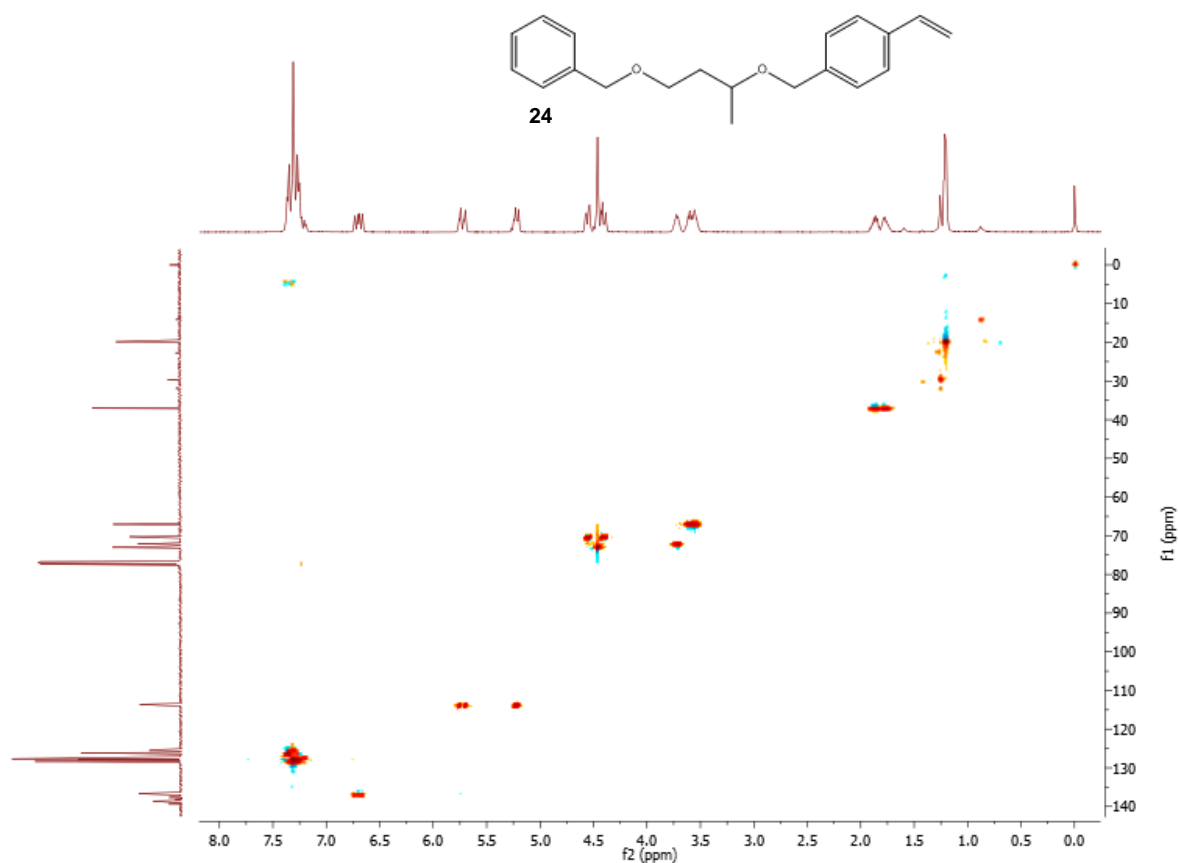


Figura 5.77: Espectro de HMBC (CDCl_3) do 1-(((4-(benziloxy)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **24**.

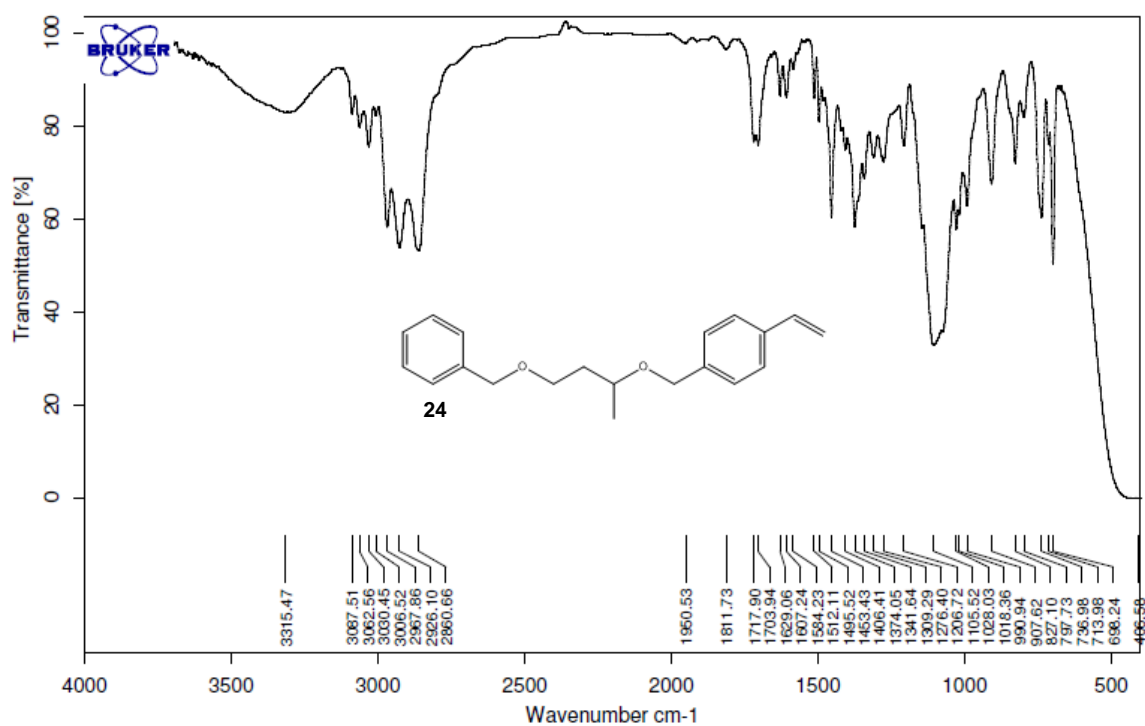


Figura 5.78: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-(((4-(benziloxy)butan-2-il)oxi)metil)-4-vinilbenzeno, **24**.

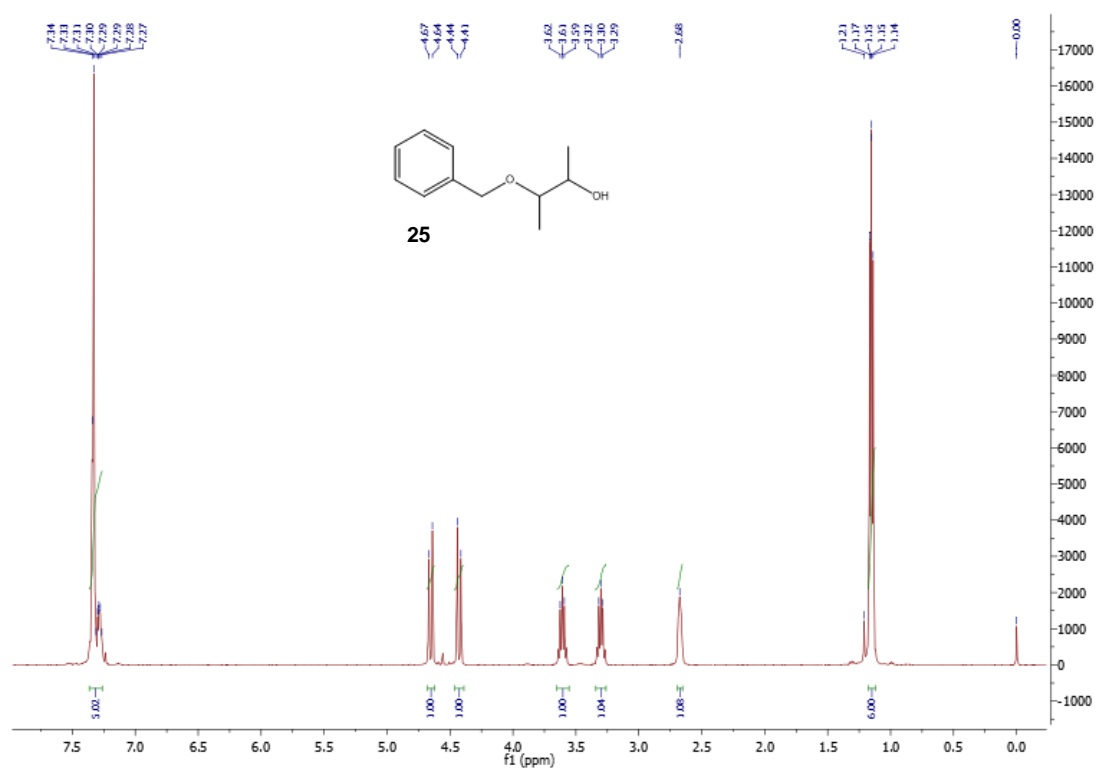


Figura 5.79: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.

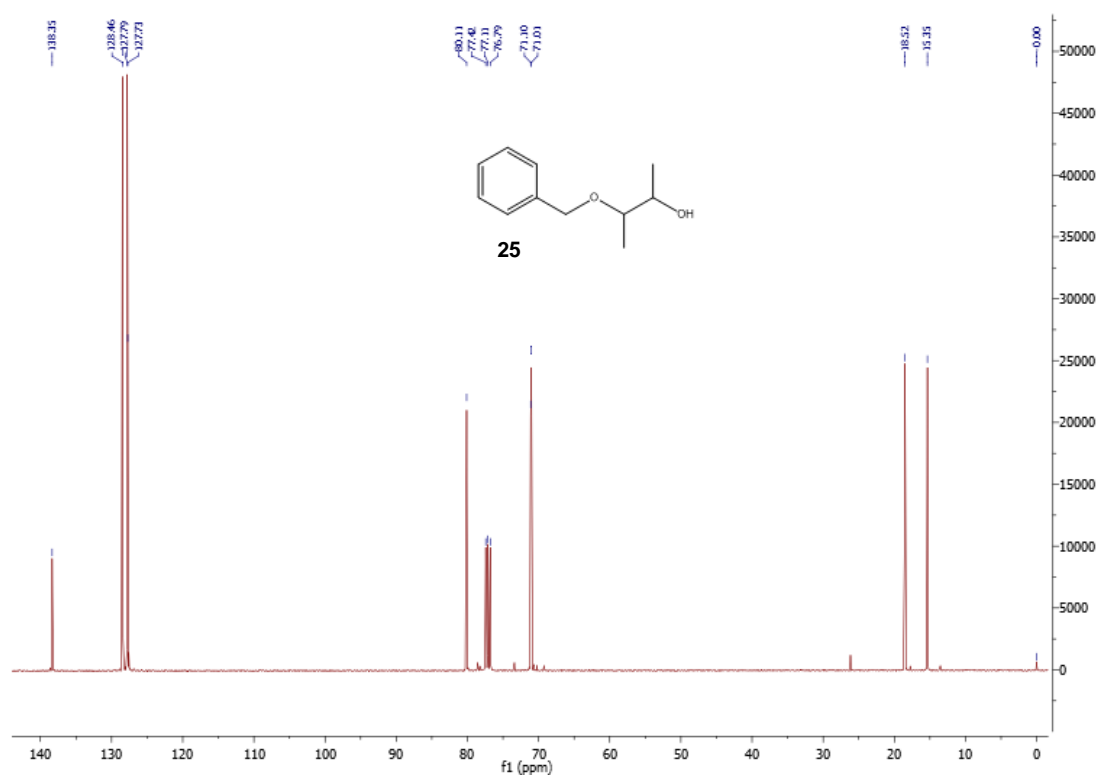


Figura 5.80: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.



Figura 5.81: Espectro de DEPT (101 MHz, CDCl₃) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.

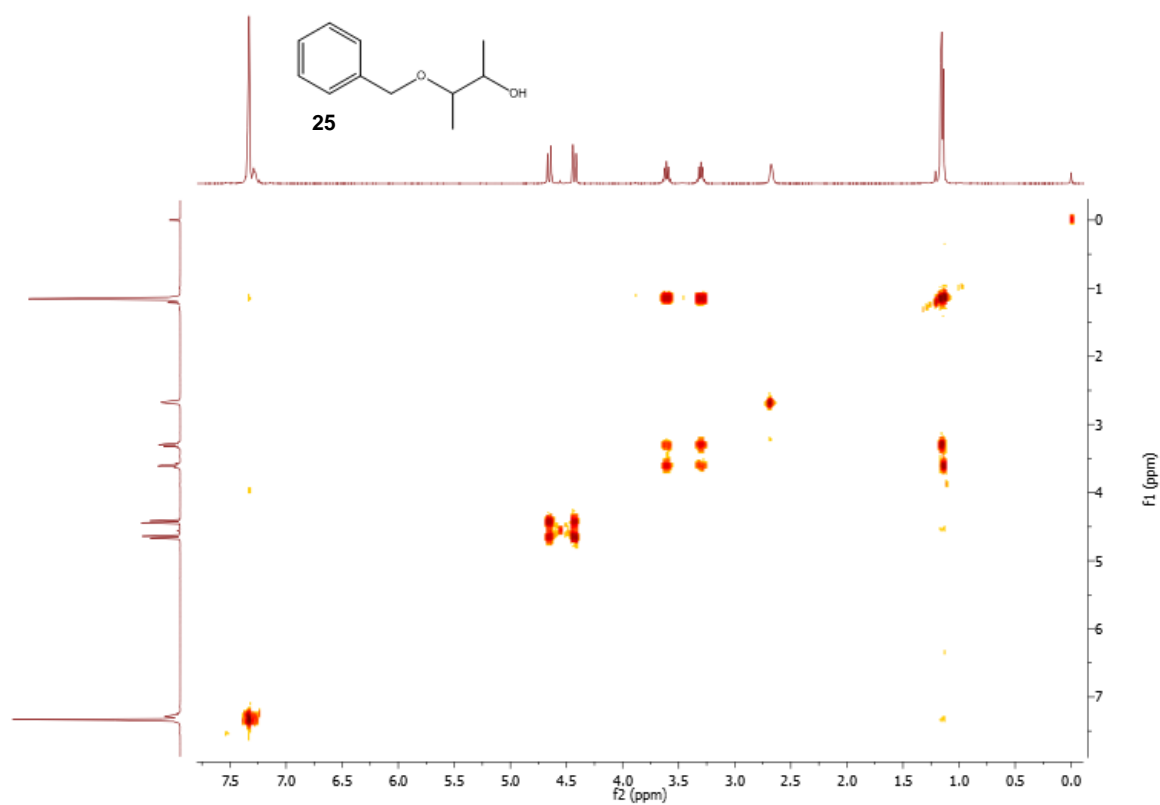
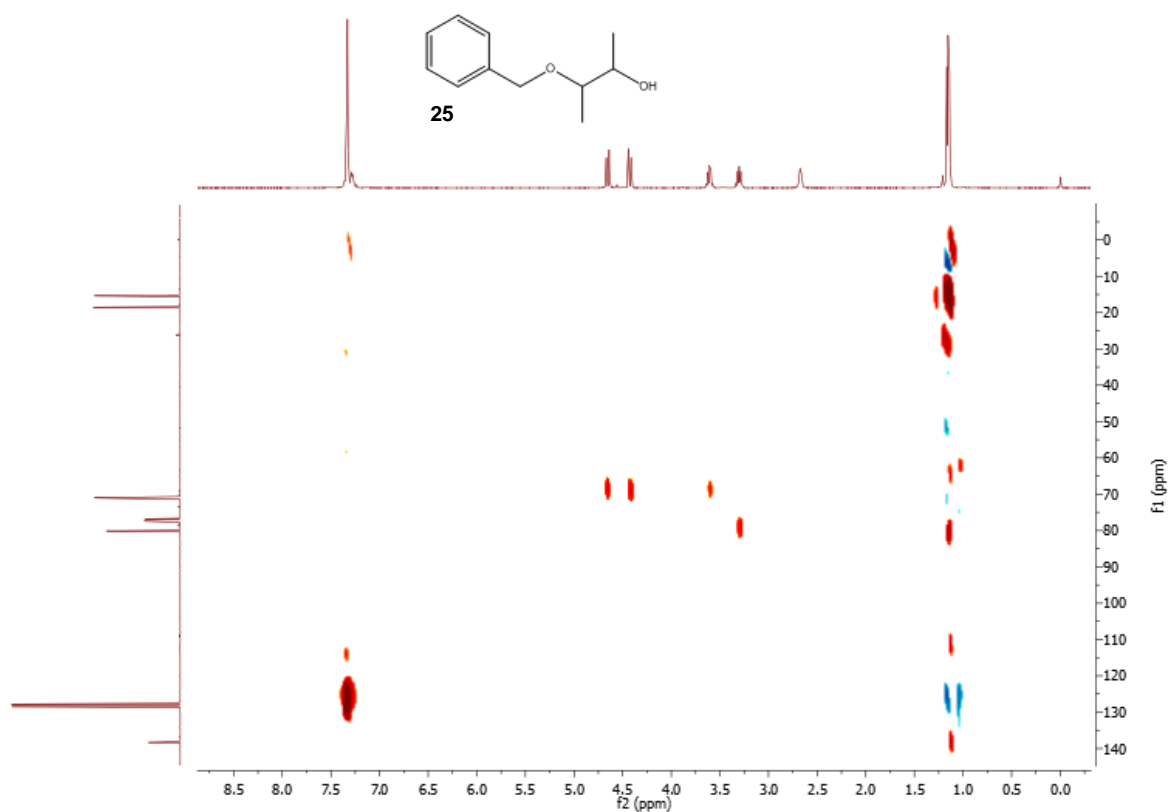
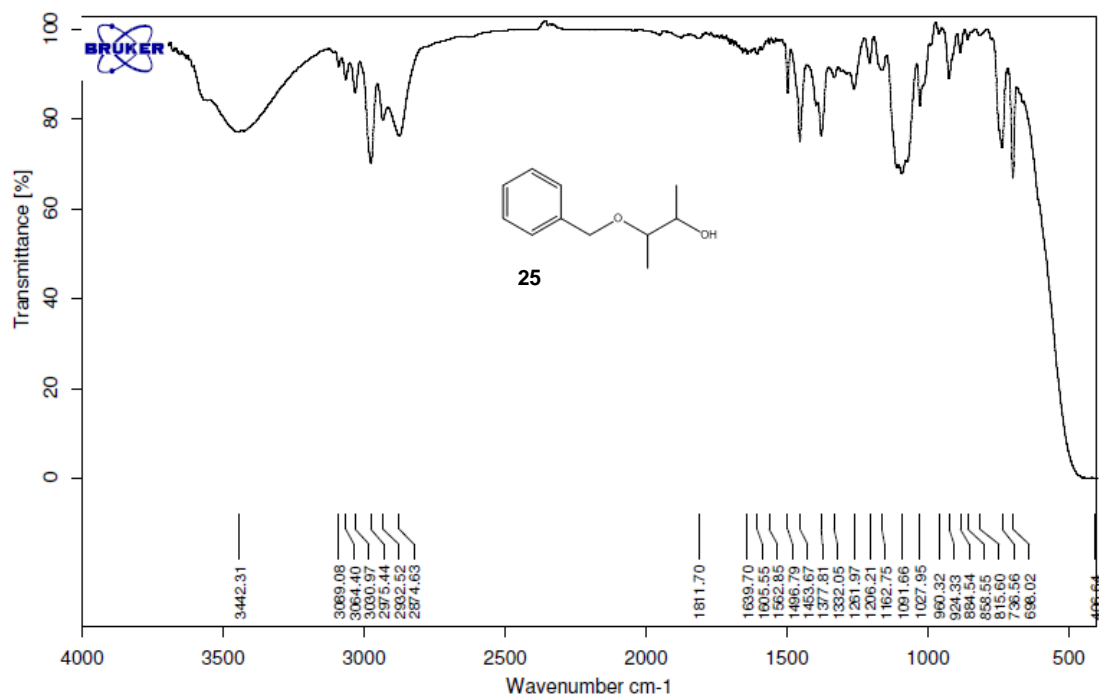


Figura 5.82: Espectro de COSY (CDCl₃) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.

Figura 5.83: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.Figura 5.84: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 3-(benziloxy)butan-2-ol, **25**.

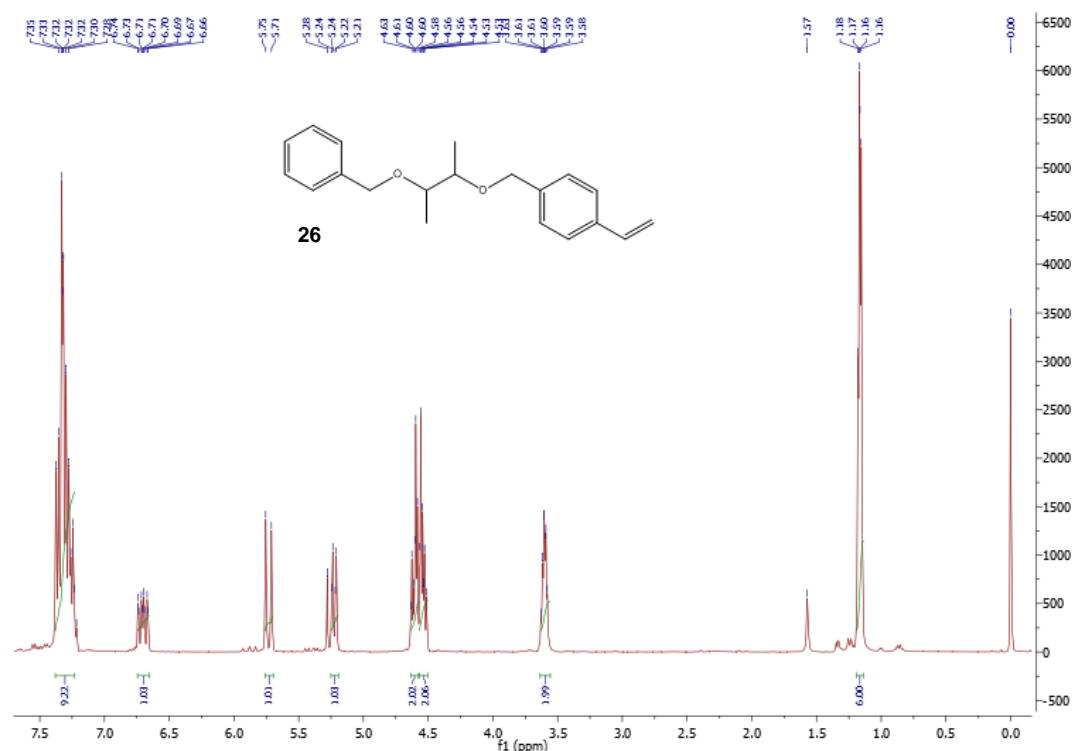


Figura 5.85: Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, **26**.

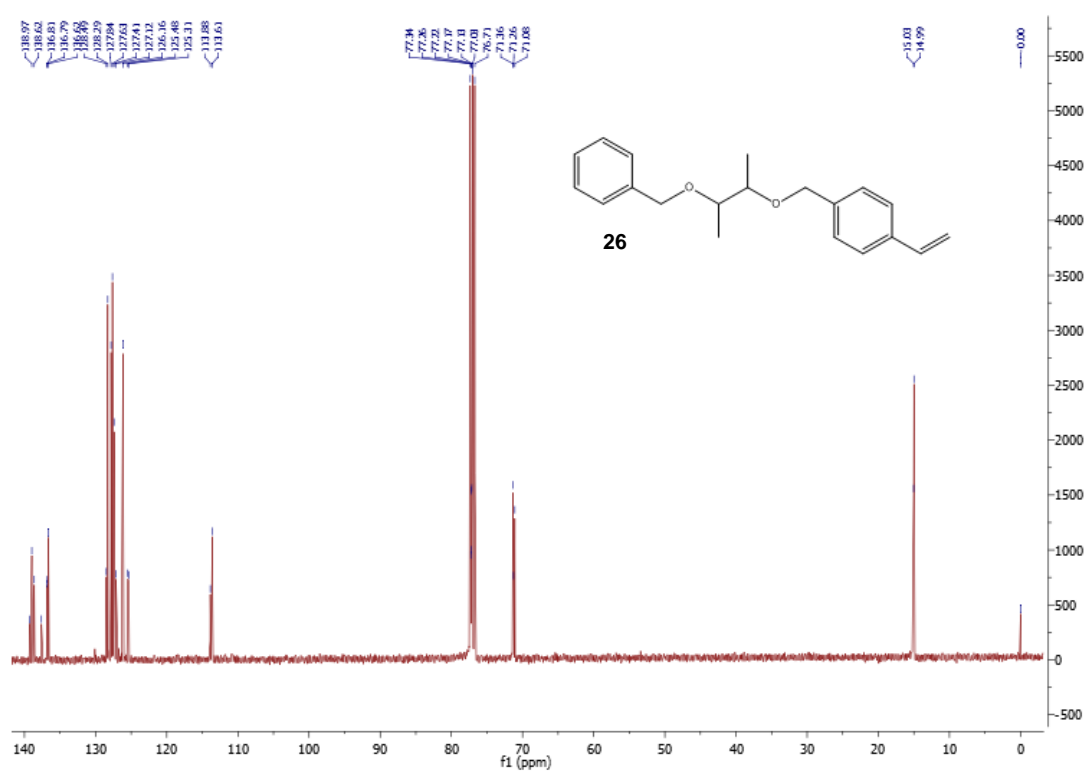
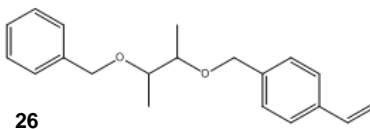
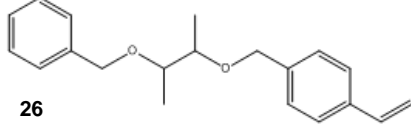


Figura 5.86: Espectro de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, **26**.



26



26

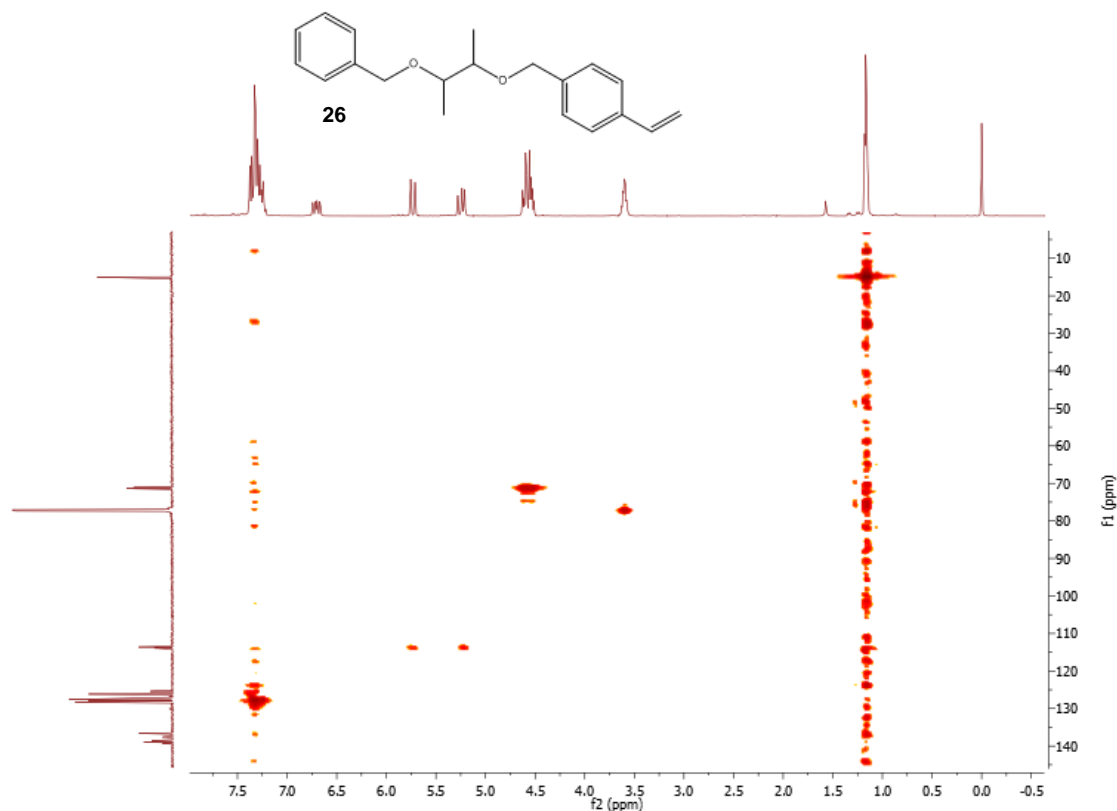


Figura 5.89: Espectro de HMQC (CDCl_3) do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, **26**.

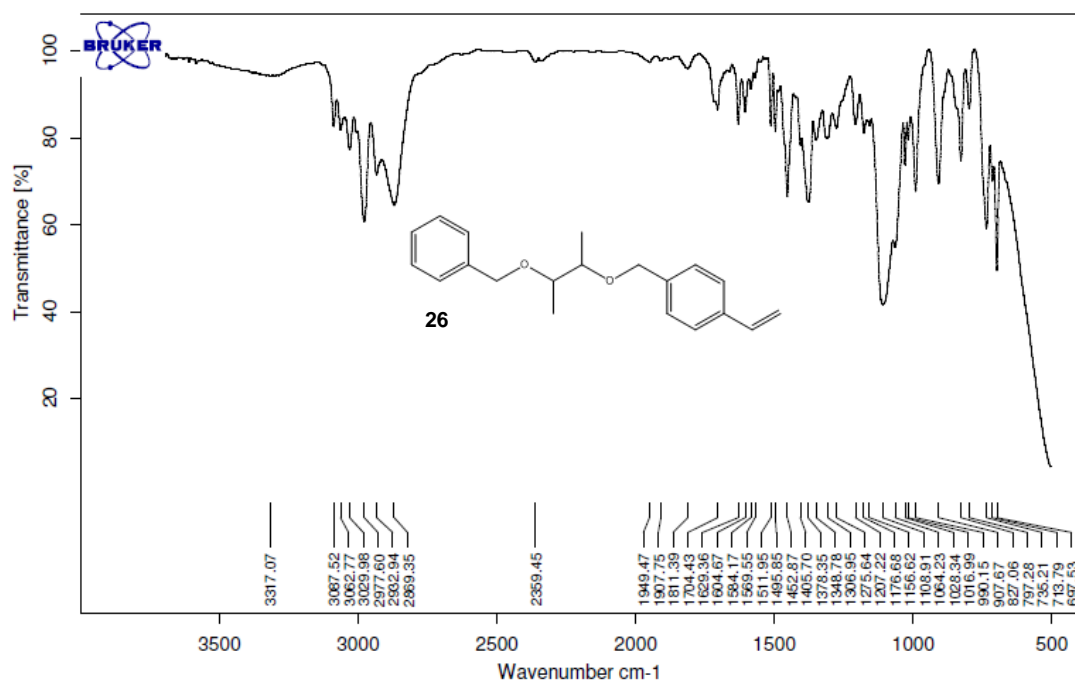


Figura 5.90: Espectro de Infravermelho (NaCl) do 1-(((3-benziloxi)butan-2-il)oxi)metil)4-vinilbenzeno, **26**.

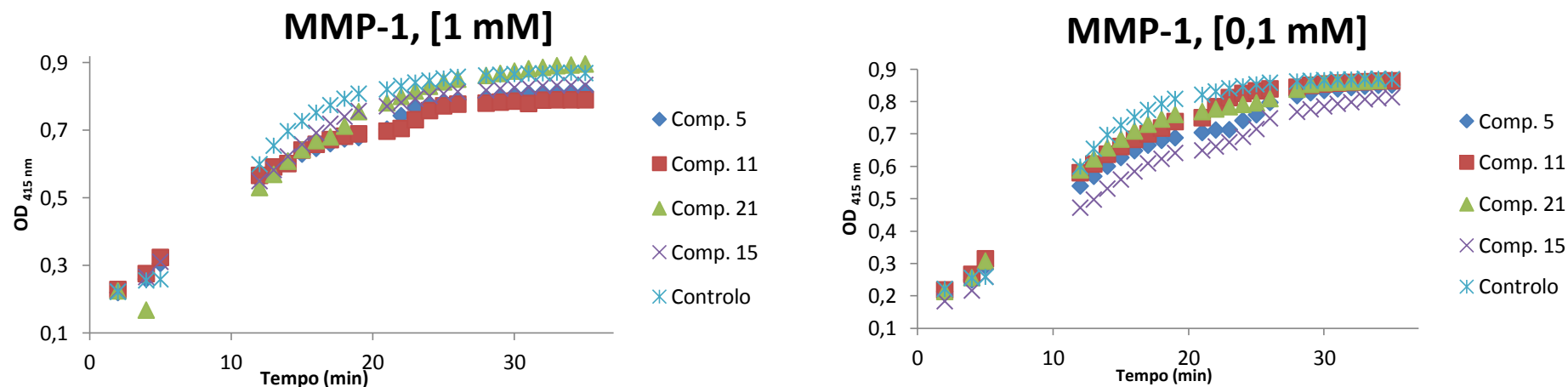


Figura 5.91: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.

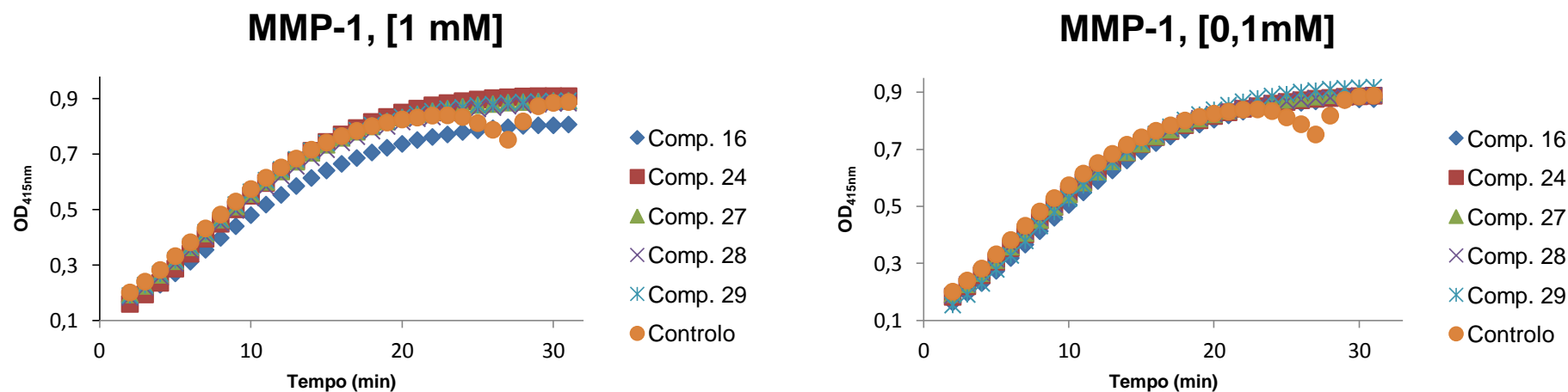


Figura 5.92: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.

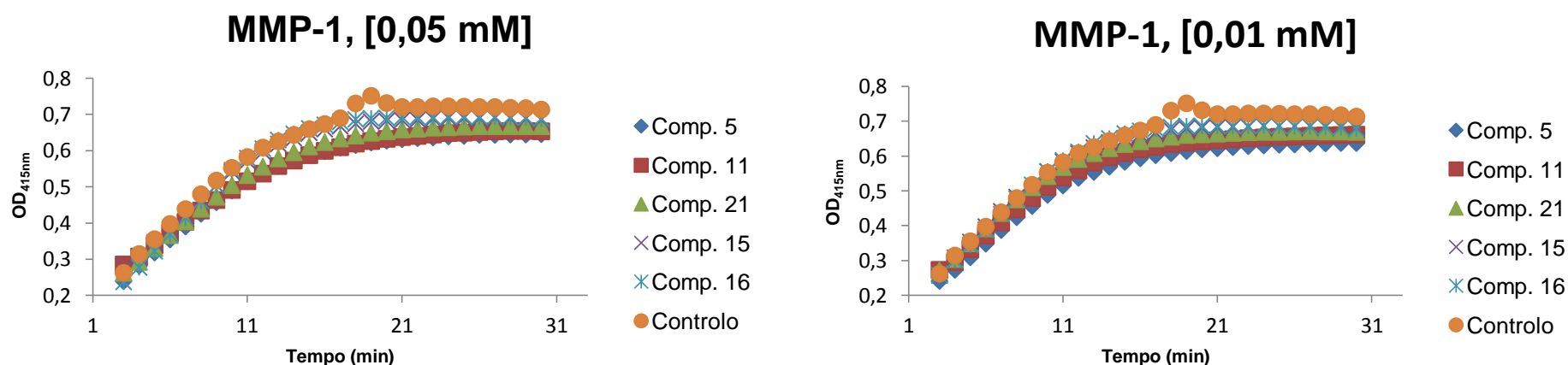


Figura 5.93: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos **5**, **11**, **15**, **16** e **21** a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.

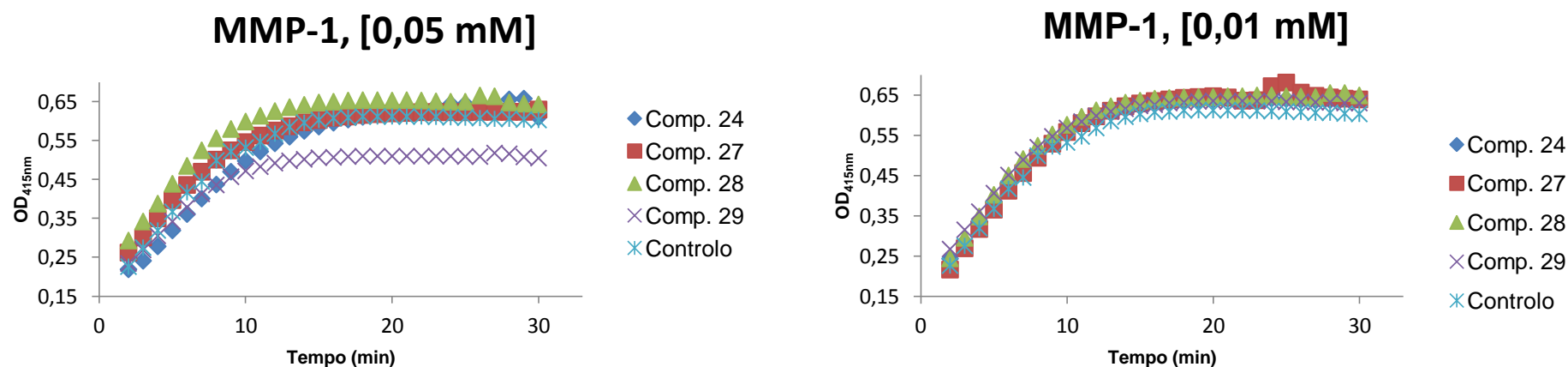


Figura 5.94: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos **24**, **27**, **28** e **29** a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-1.

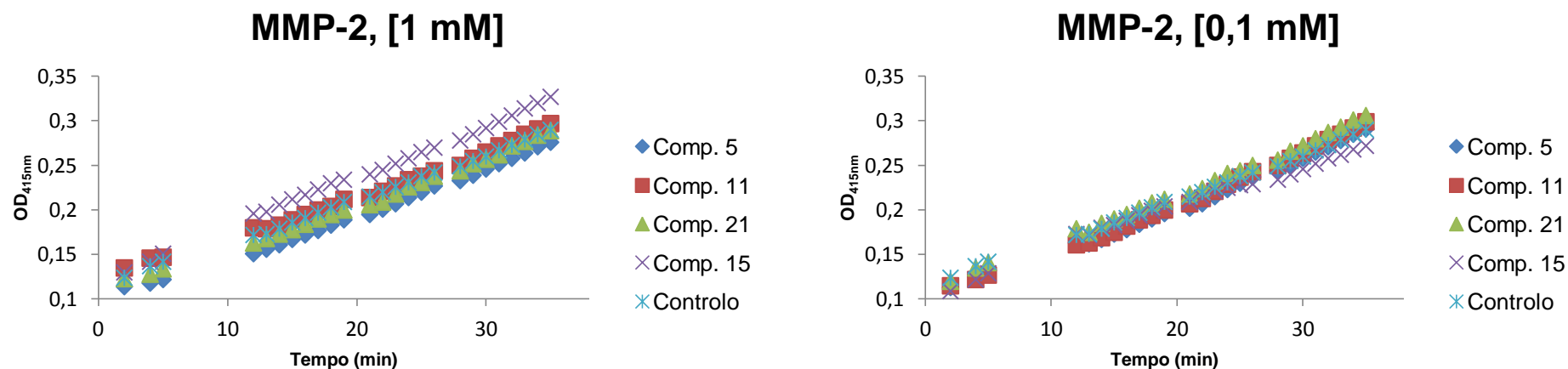


Figura 5.95: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 21 e 15 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.

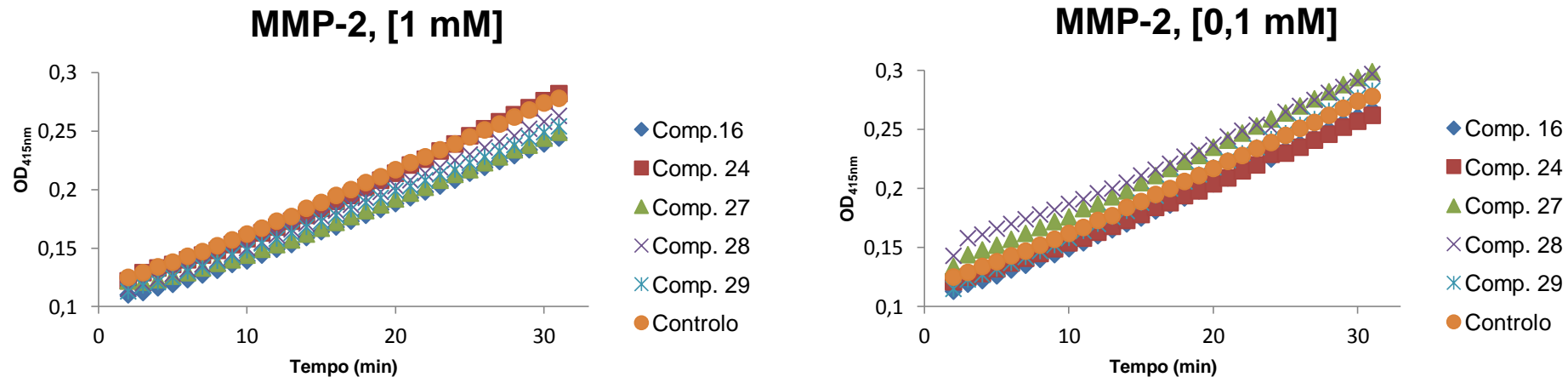


Figura 5.96: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.

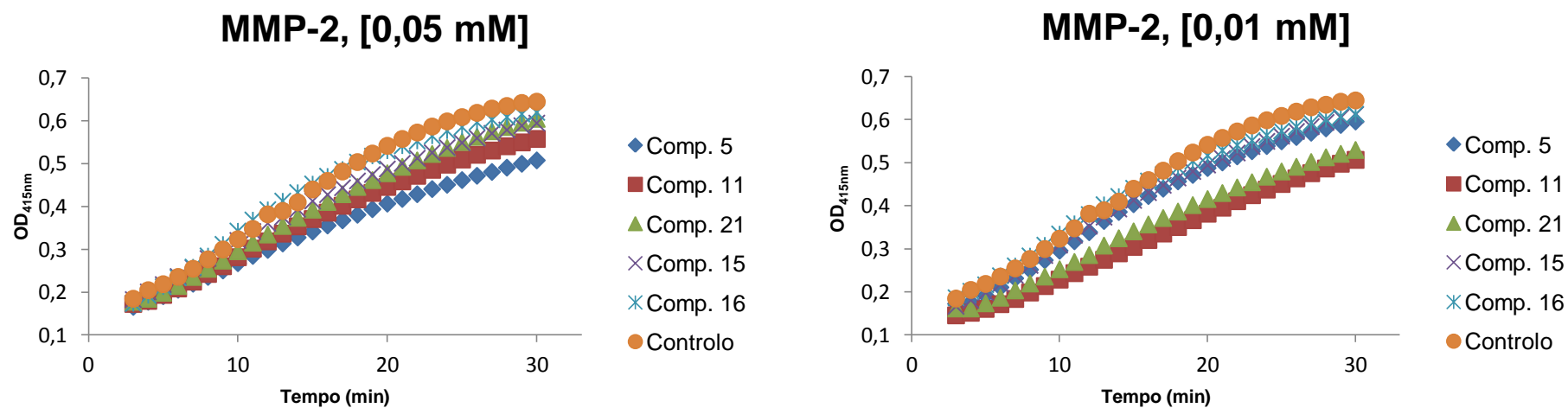


Figura 5.97: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.

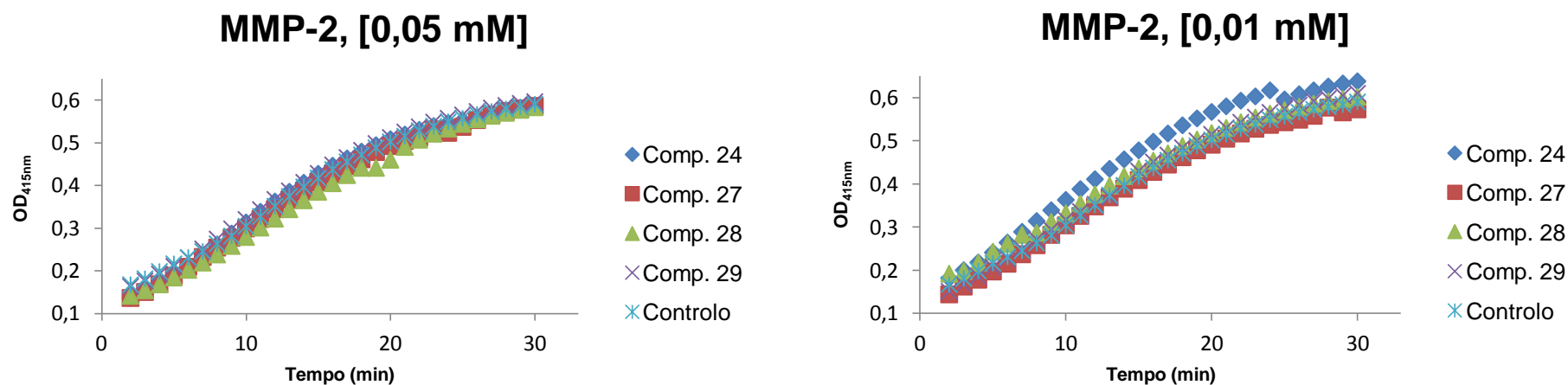


Figura 5.98: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28, e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-2.

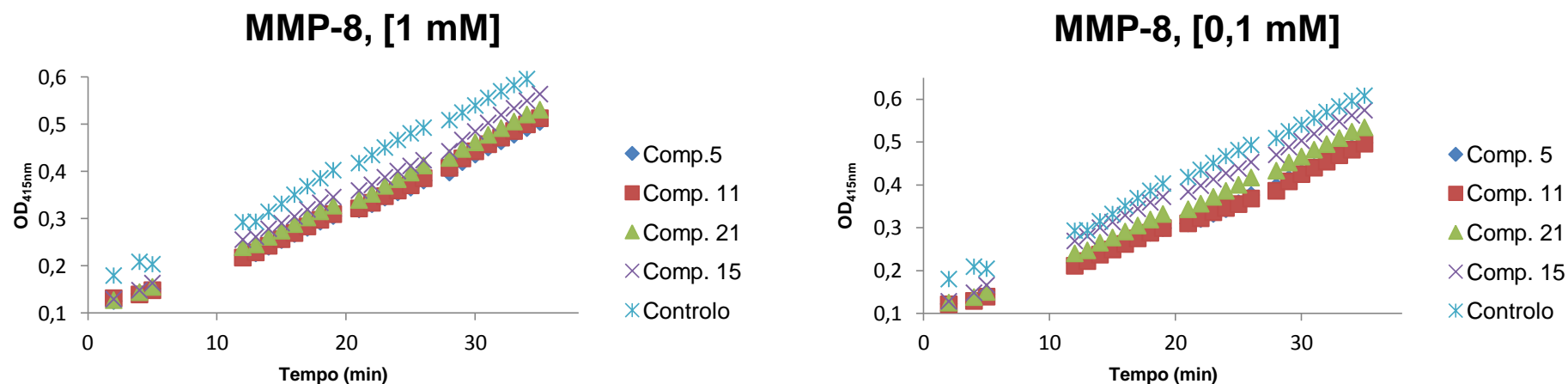


Figura 5.99: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.

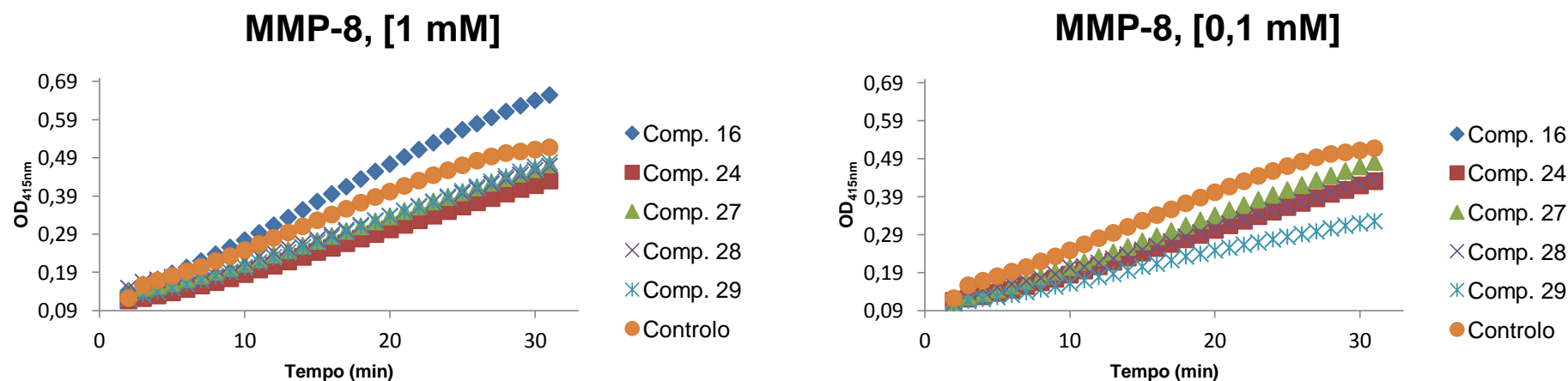


Figura 5.100: Gráficos de OD_{415 nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.

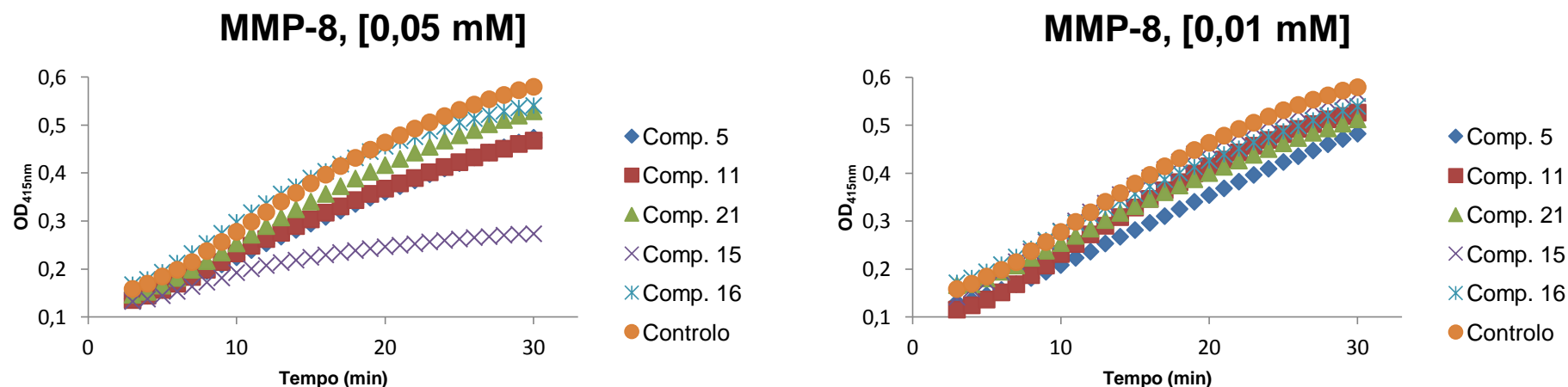


Figura 5.101: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.

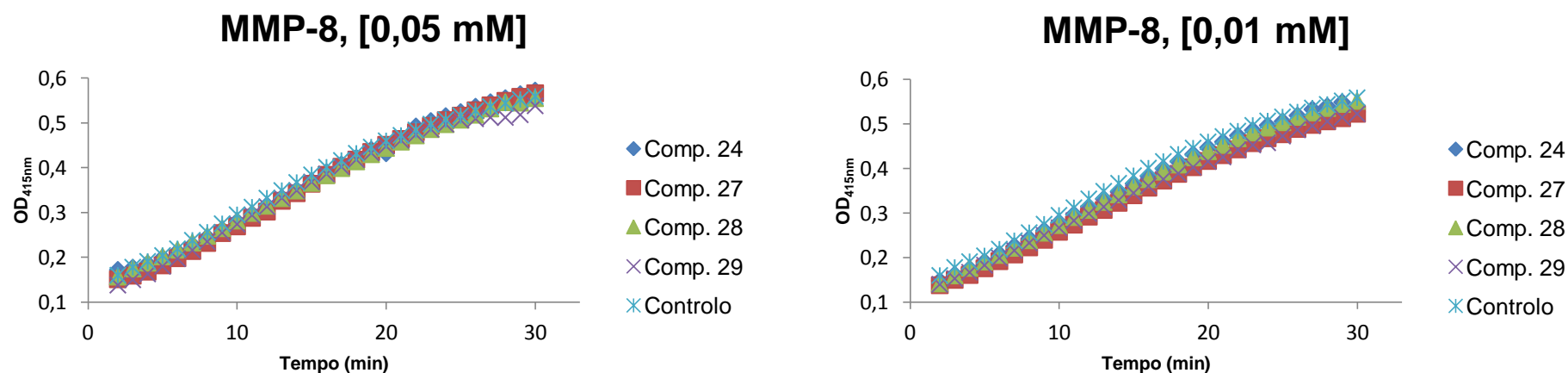


Figura 5.102: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-8.

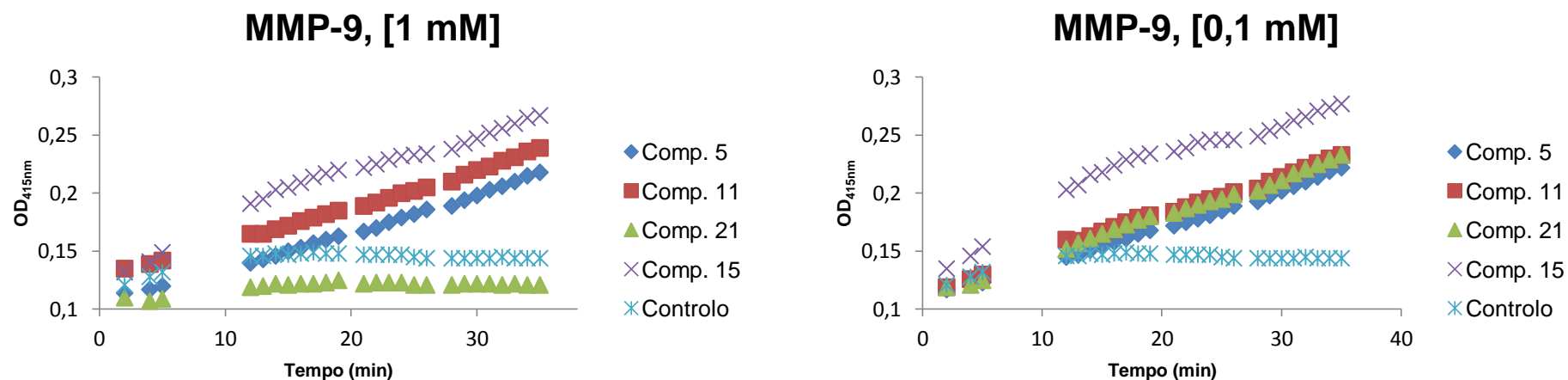


Figura 5.103: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.

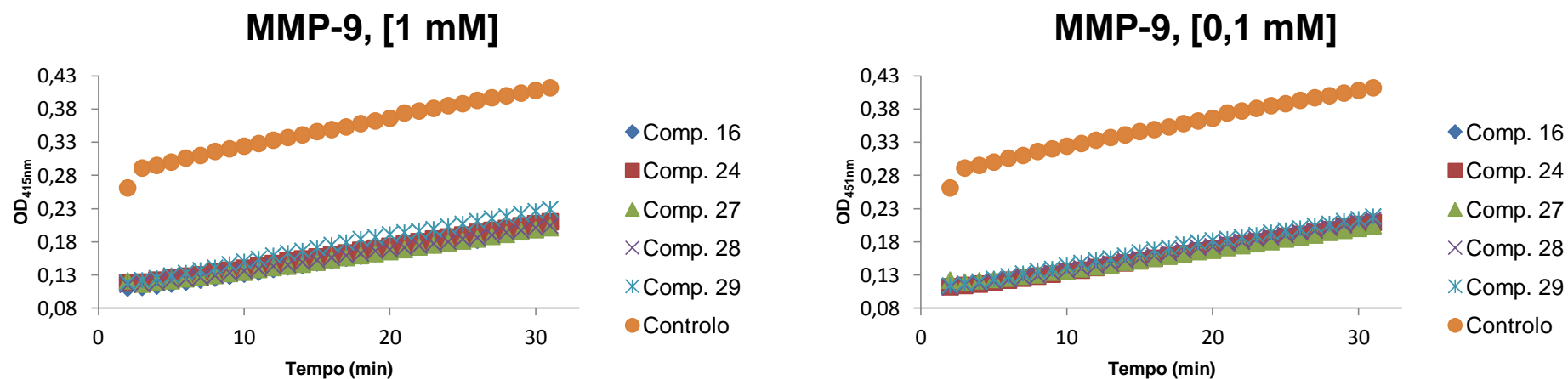


Figura 5.104: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.

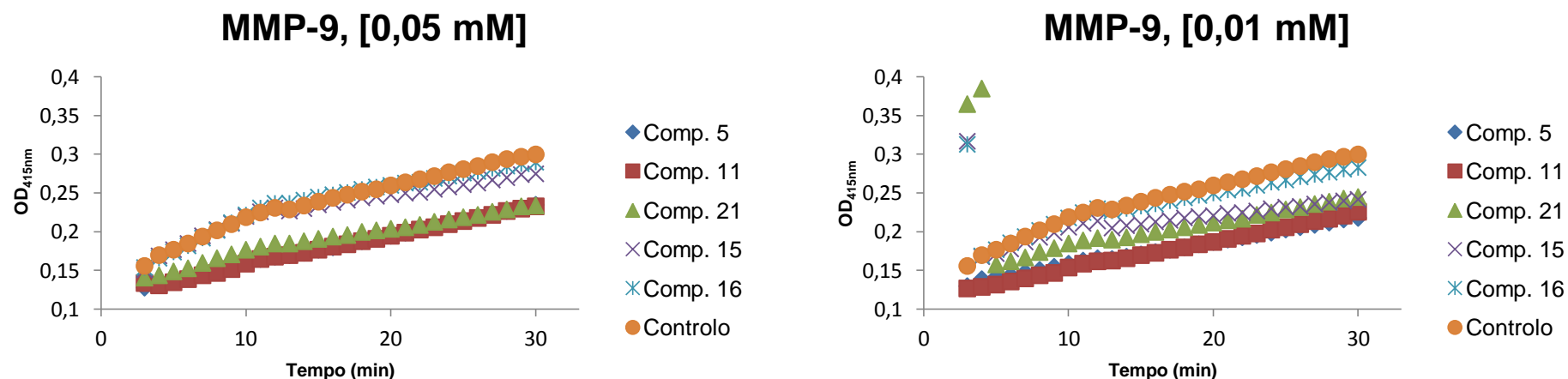


Figura 5.105: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.

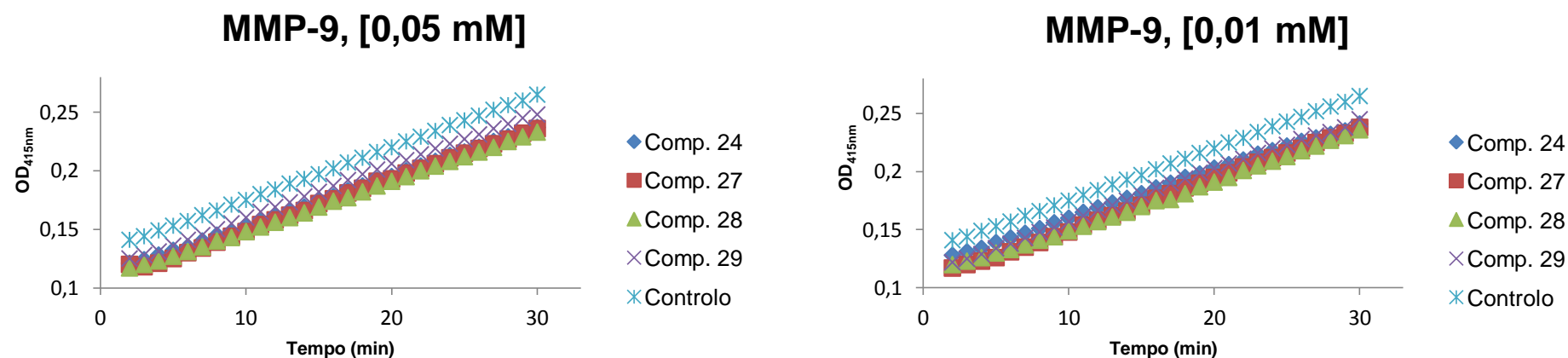


Figura 5.106: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-9.

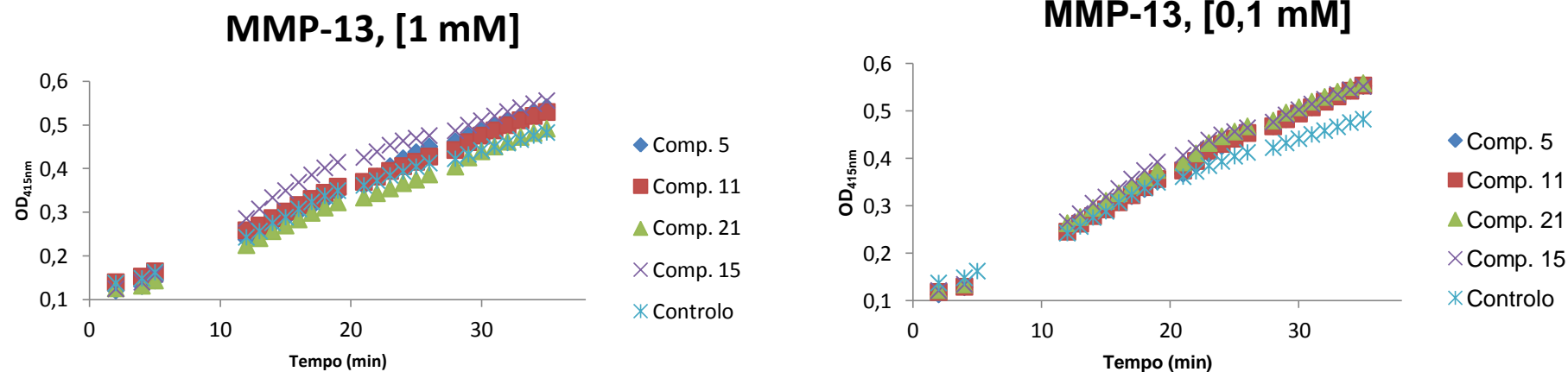


Figura 5.107: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15 e 21 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.

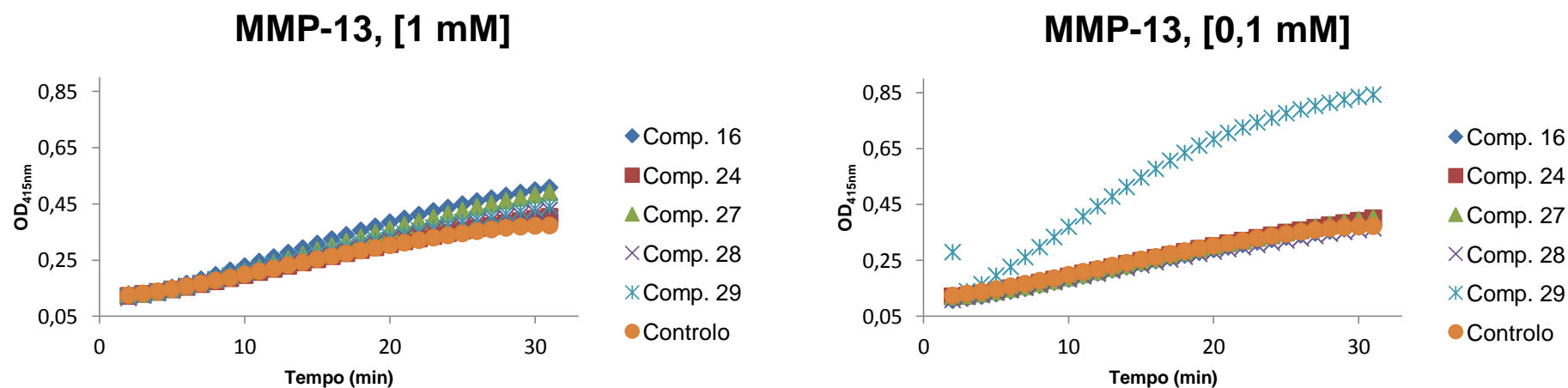


Figura 5.108: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 16, 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.

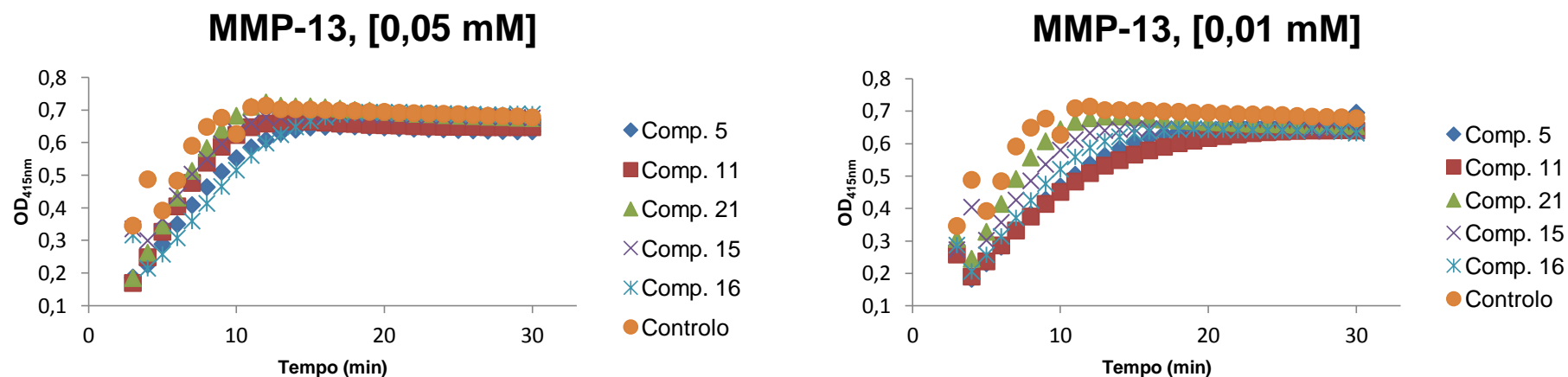


Figura 5.109: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 5, 11, 15, 16 e 21 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.

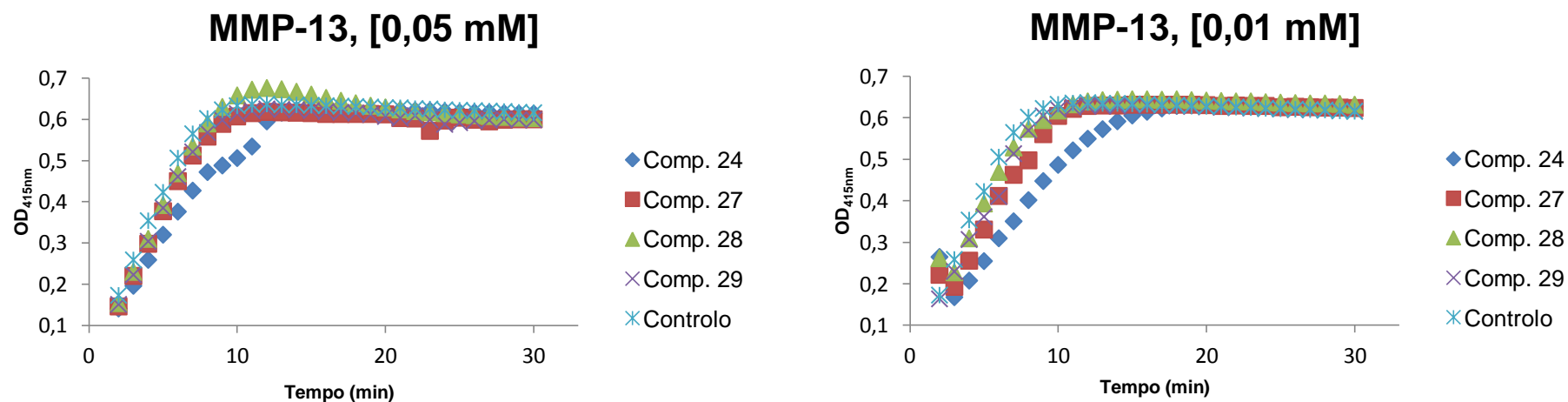


Figura 5.110: Gráficos de OD_{415nm} vs Tempo (min) para os compostos 24, 27, 28 e 29 a uma concentração de 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita), tendo como controlo a MMP-13.

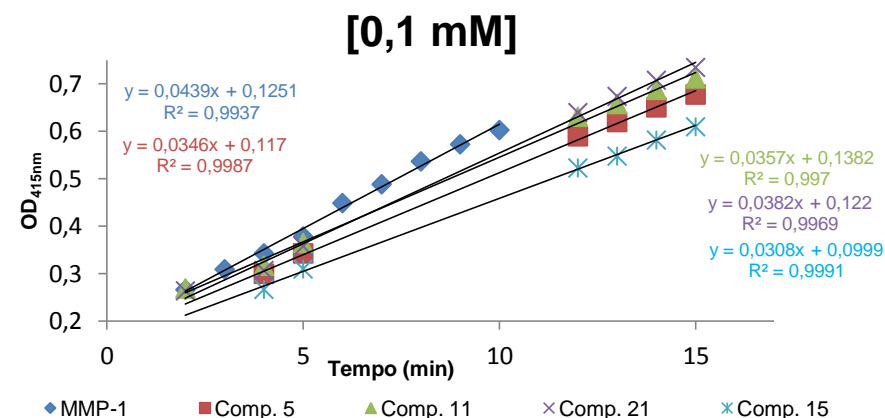
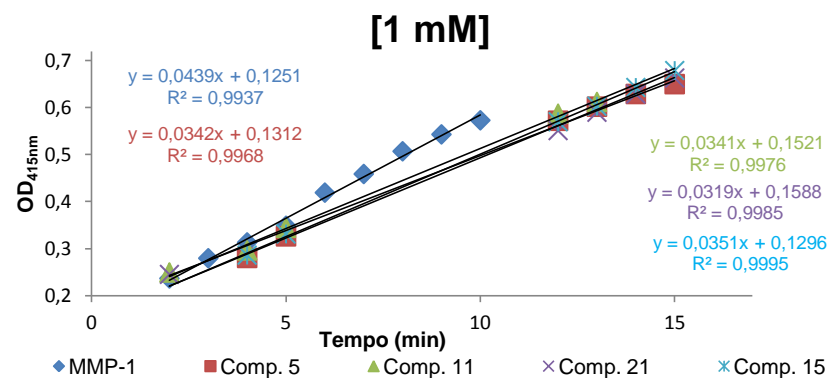


Figura 5.111: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

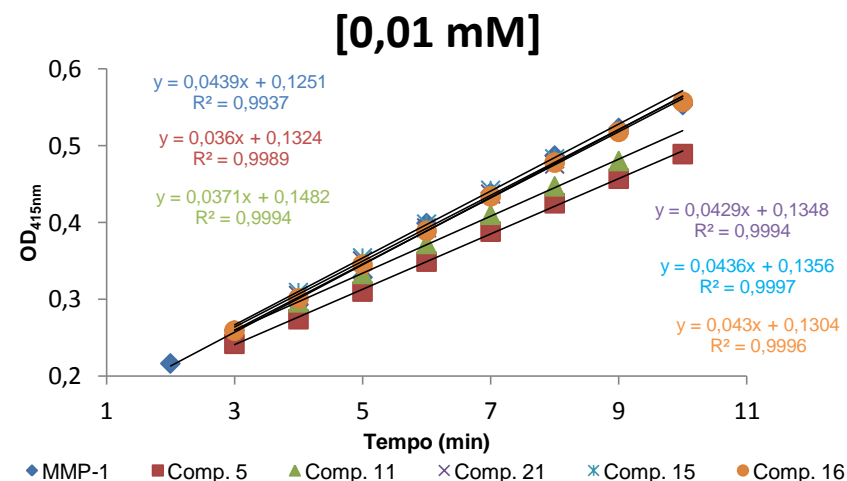
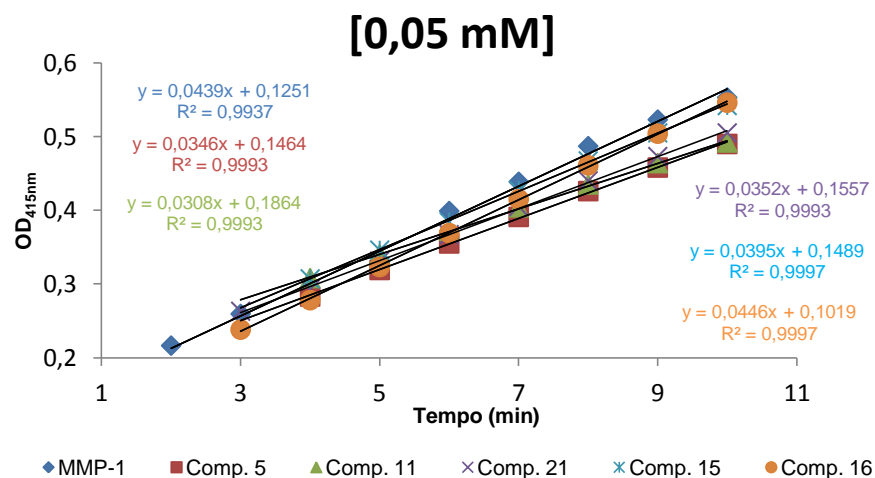


Figura 5.112: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

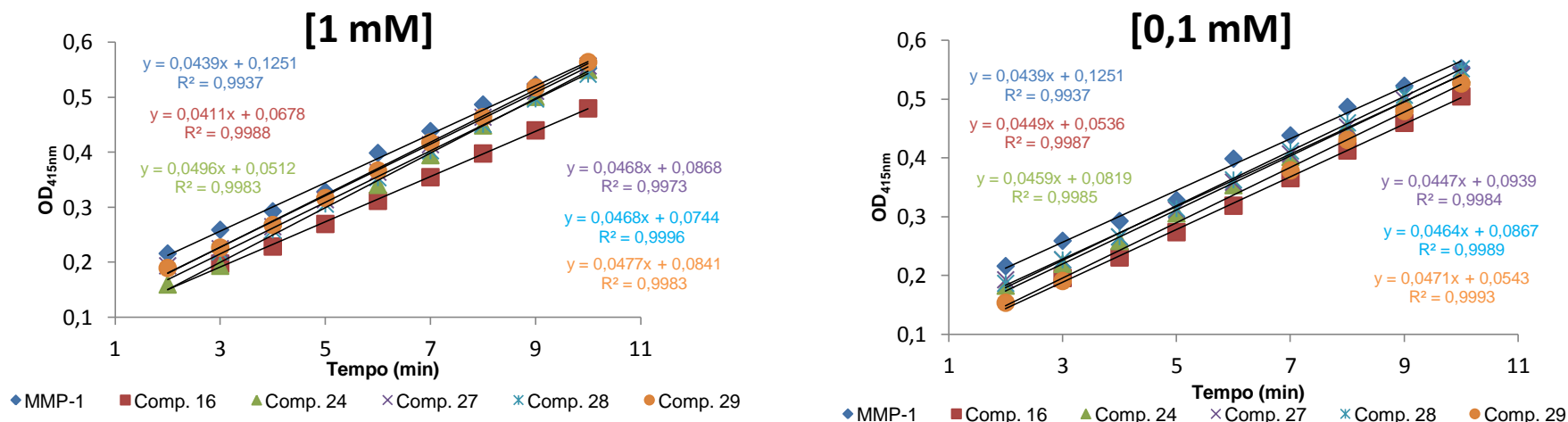


Figura 5.113: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

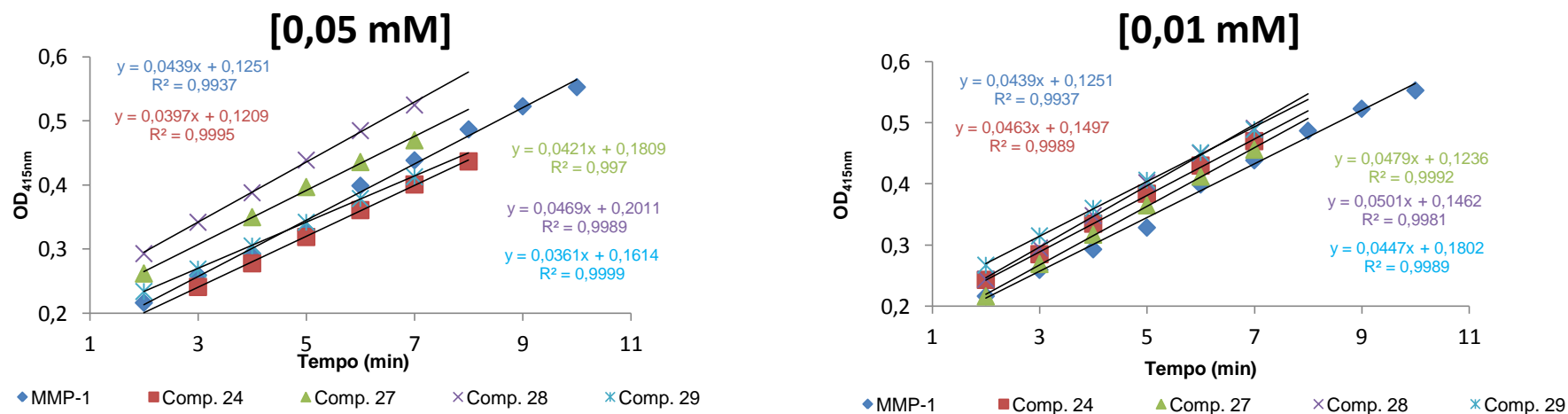


Figura 5.114: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-1 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

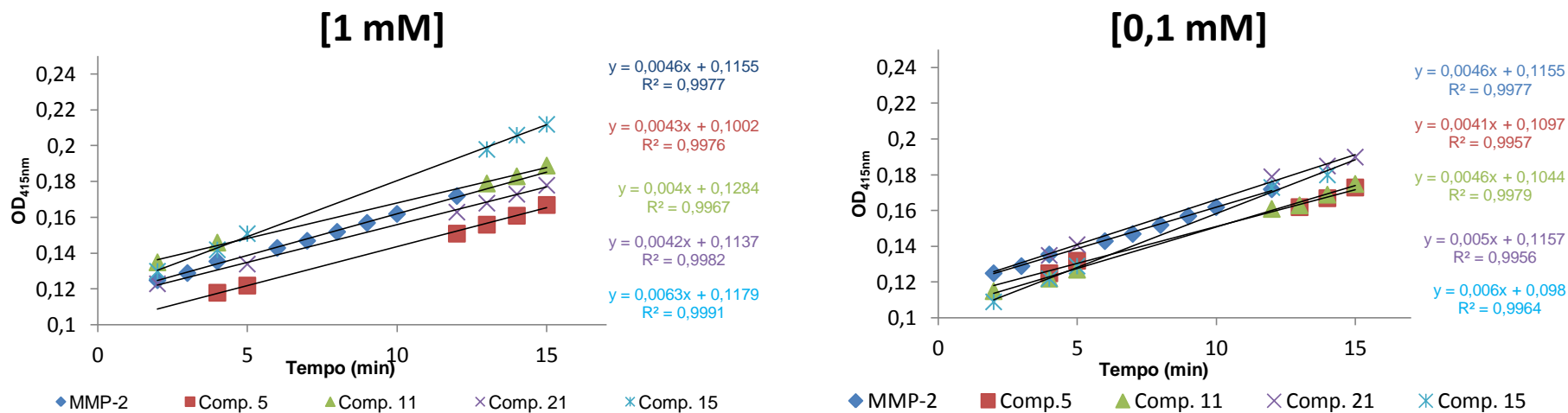


Figura 5.115: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

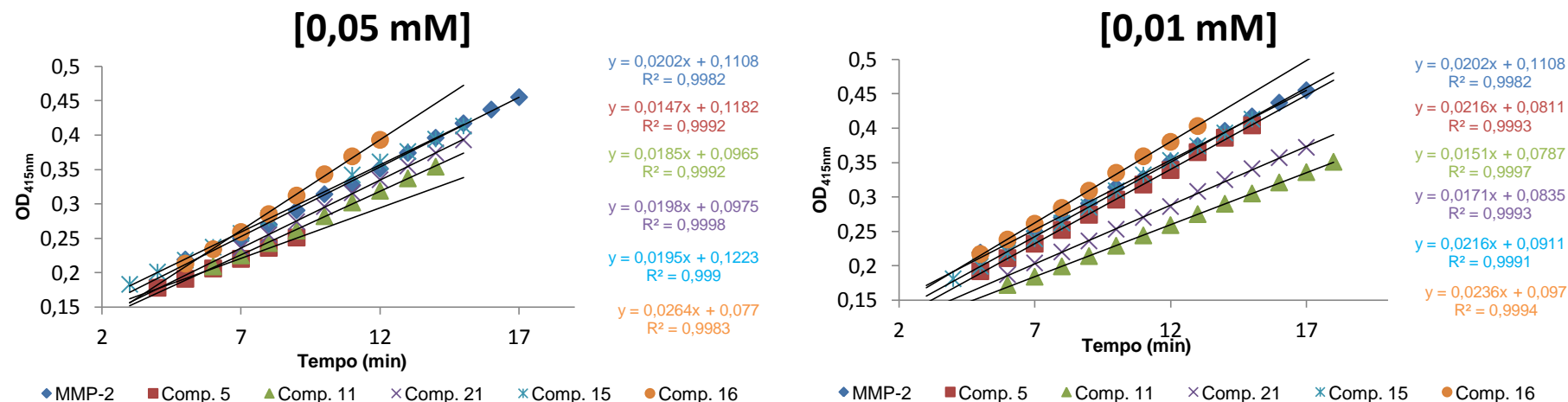


Figura 5.116: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

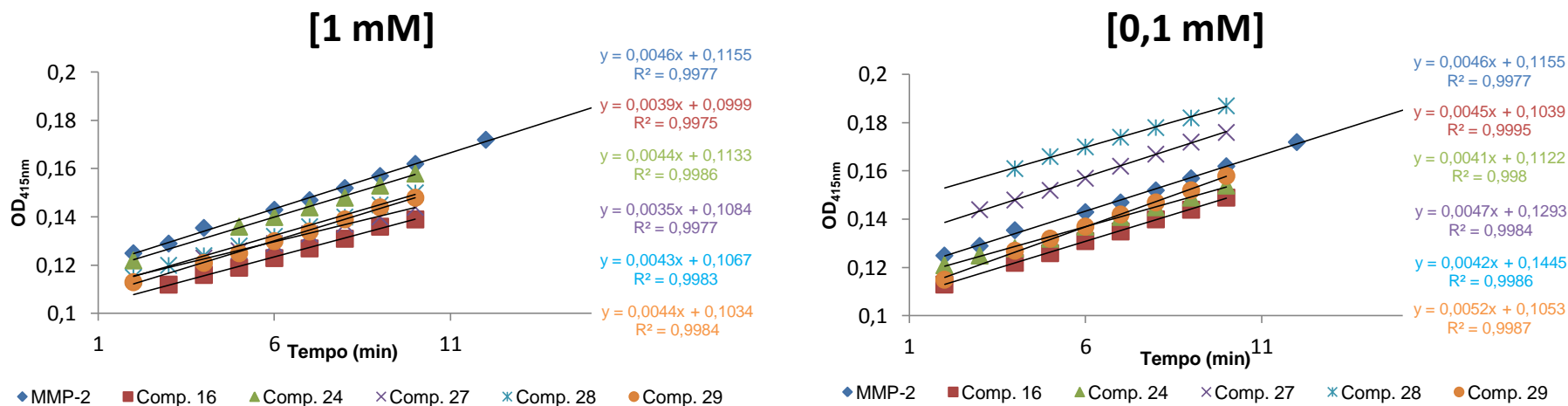


Figura 5.117: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 16, 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

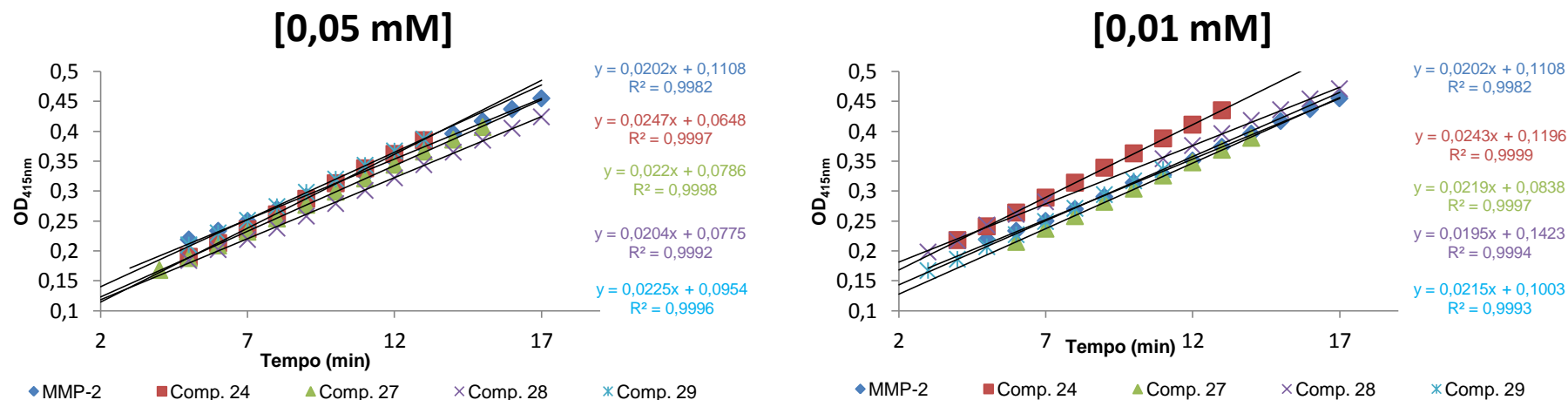


Figura 5.118: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-2 na presença dos compostos 24, 27, 28 e 29 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

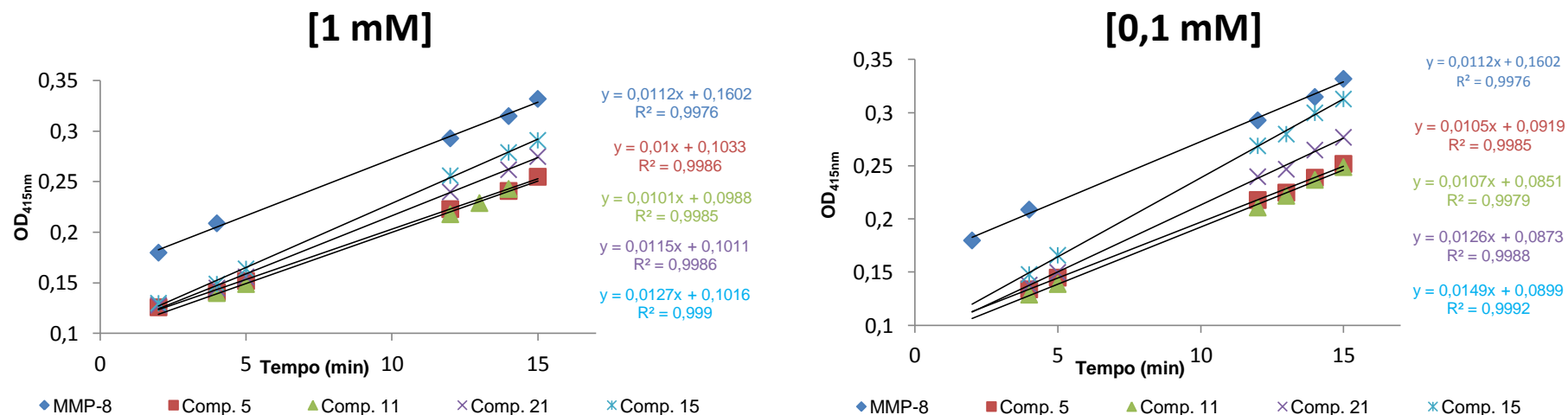


Figura 5.119: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

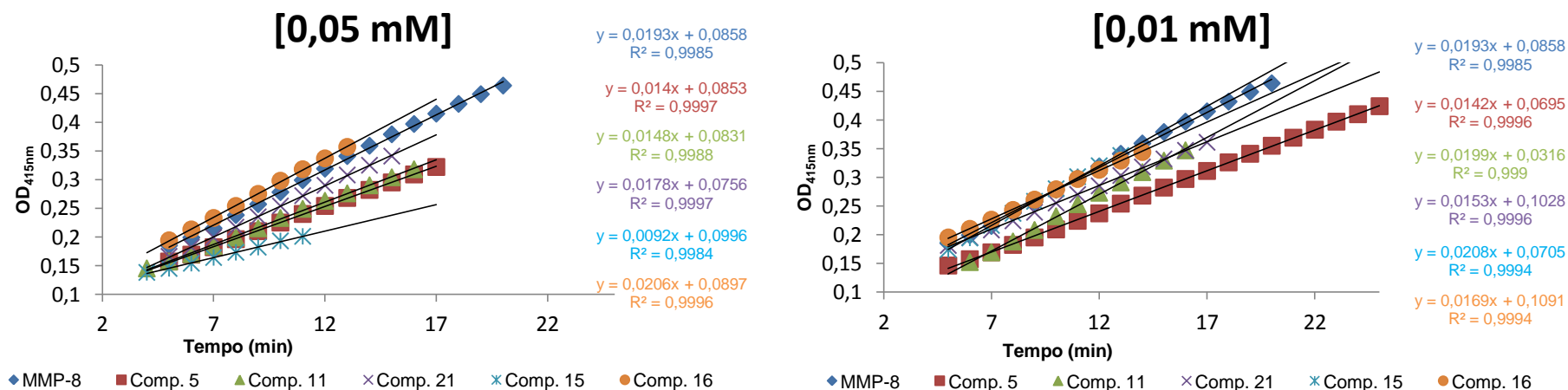


Figura 5.120: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

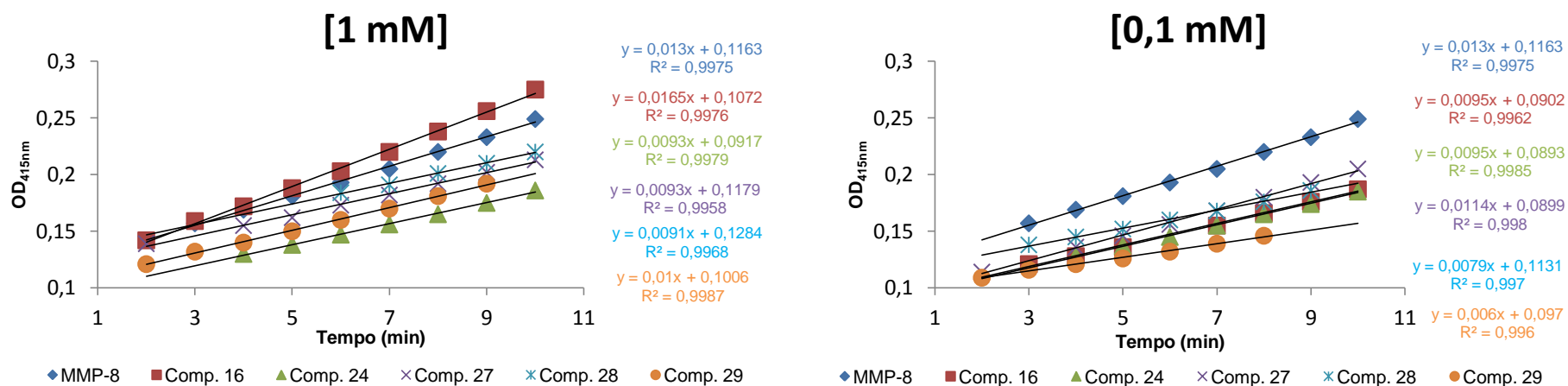


Figura 5.121: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos **16**, **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

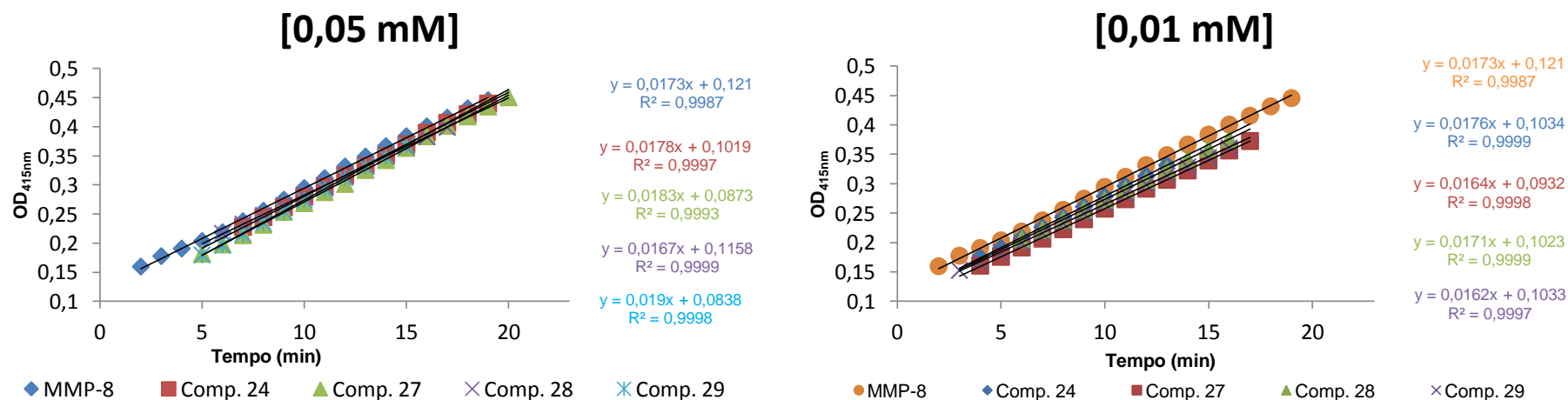


Figura 5.122: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-8 na presença dos compostos **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

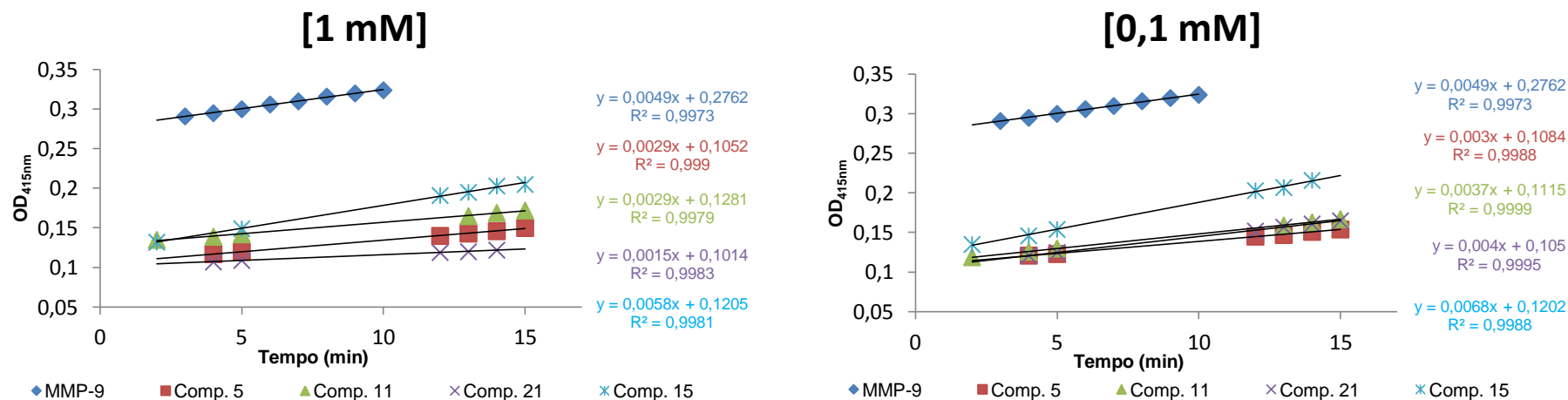


Figura 5.123: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

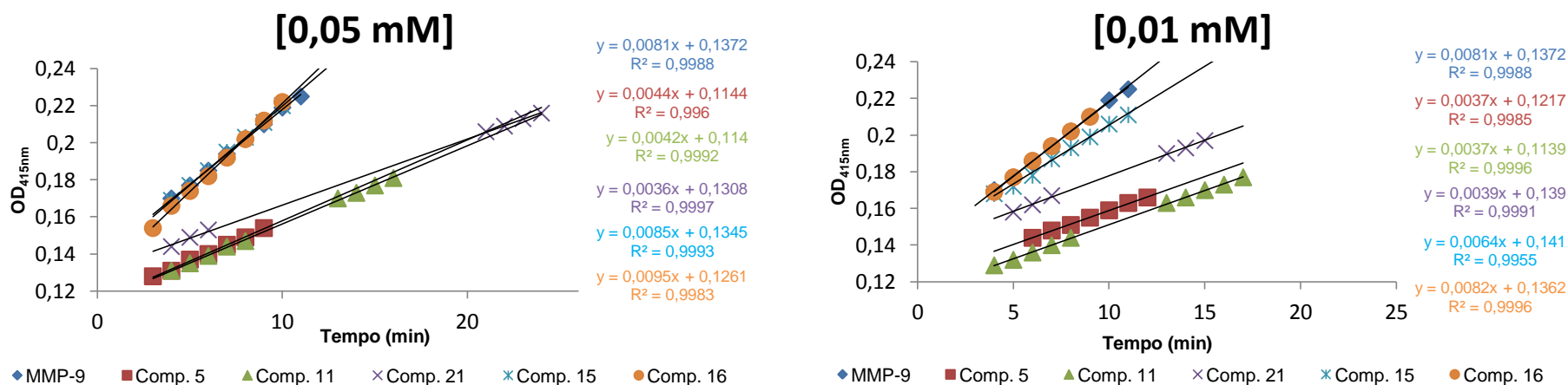


Figura 5.124: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

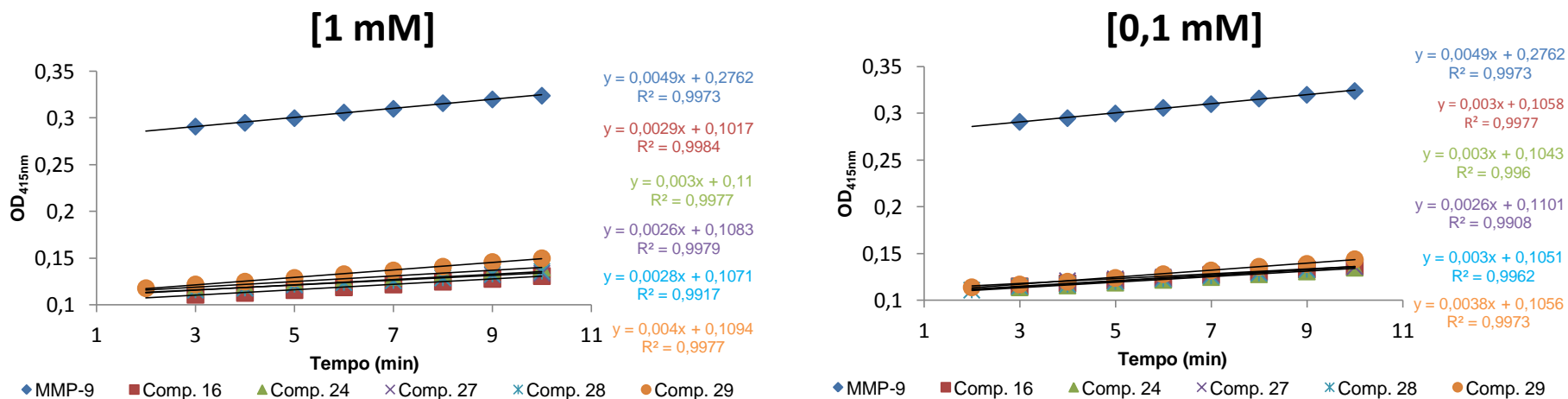


Figura 5.125: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos **16**, **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

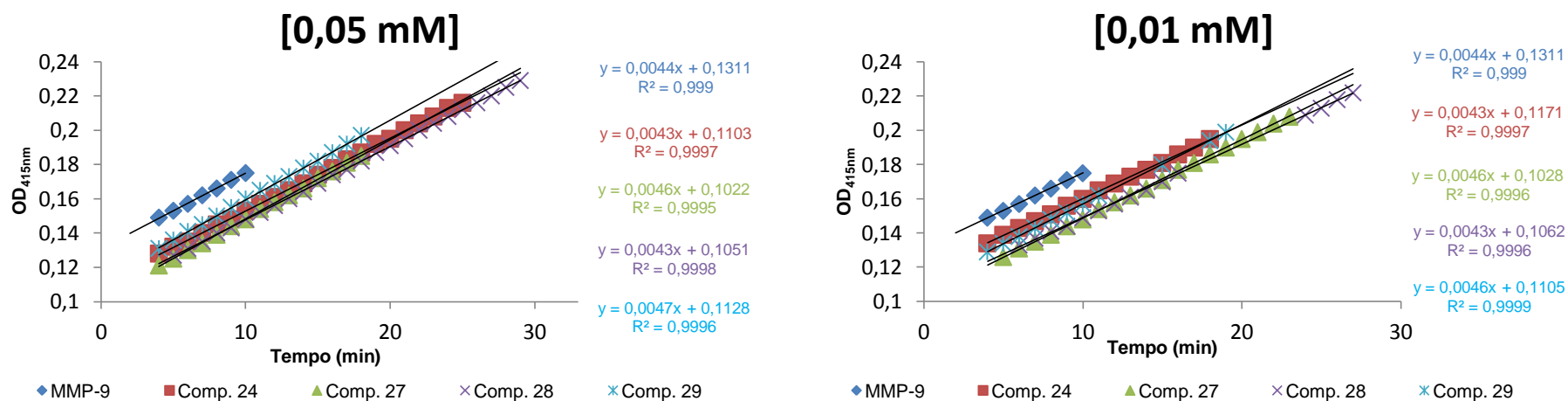


Figura 5.126: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-9 na presença dos compostos **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

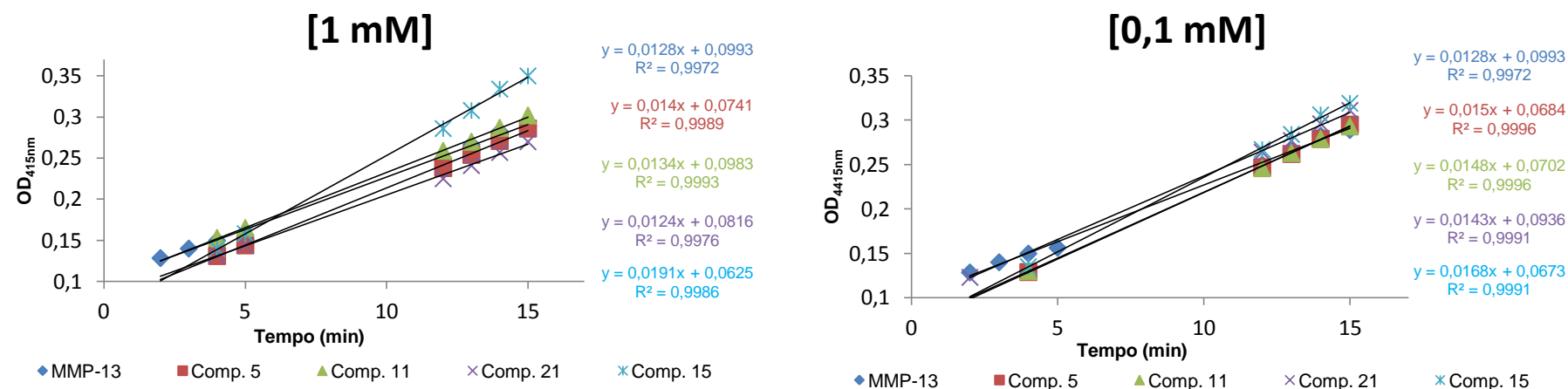


Figura 5.127: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos 5, 11, 15 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

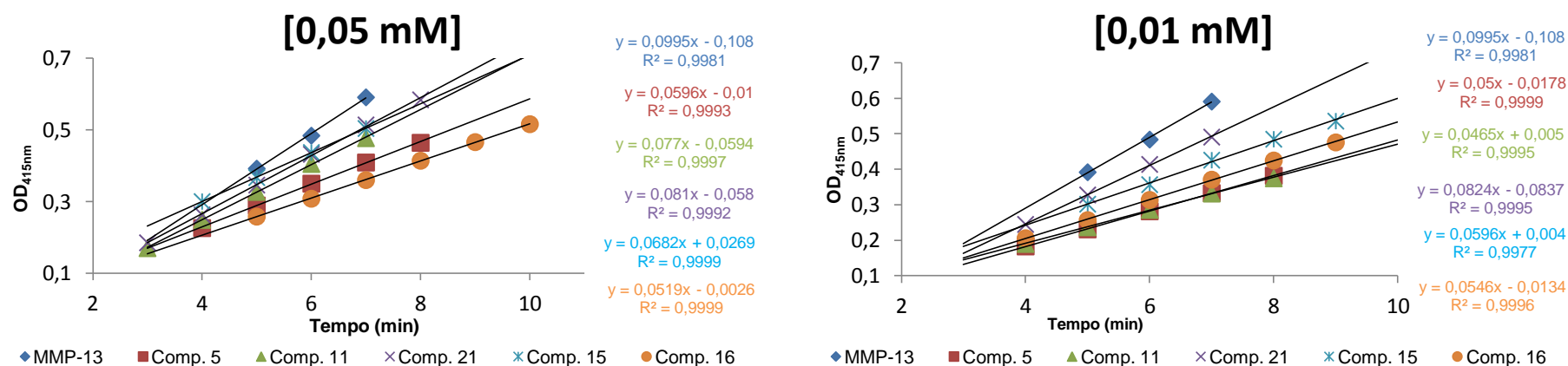


Figura 5.128: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos 5, 11, 15, 16 e 21 nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

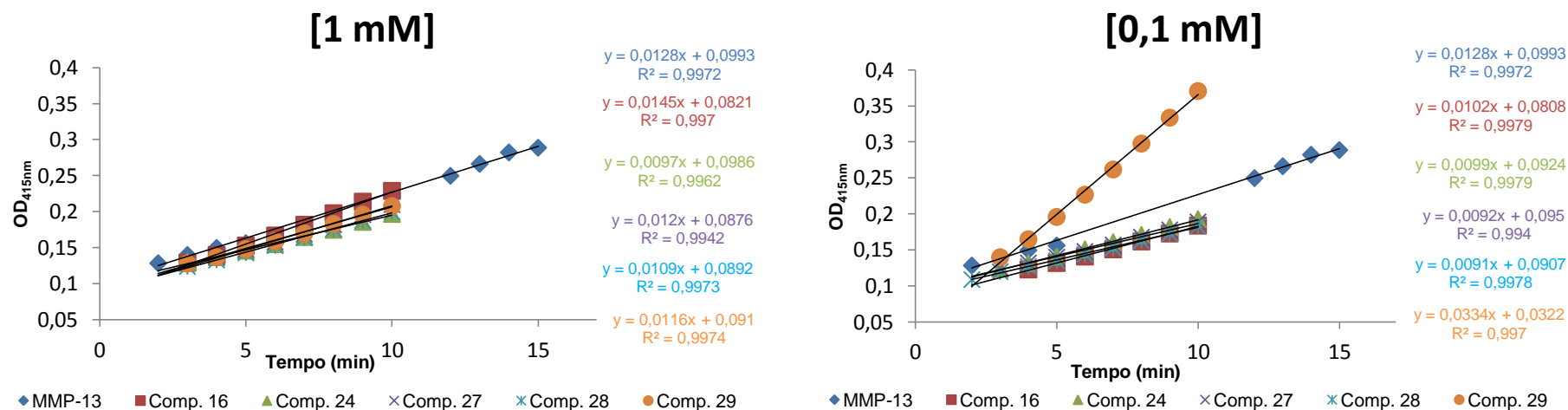


Figura 5.129: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos **16**, **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 1 mM (à esquerda) e 0,1 mM (à direita).

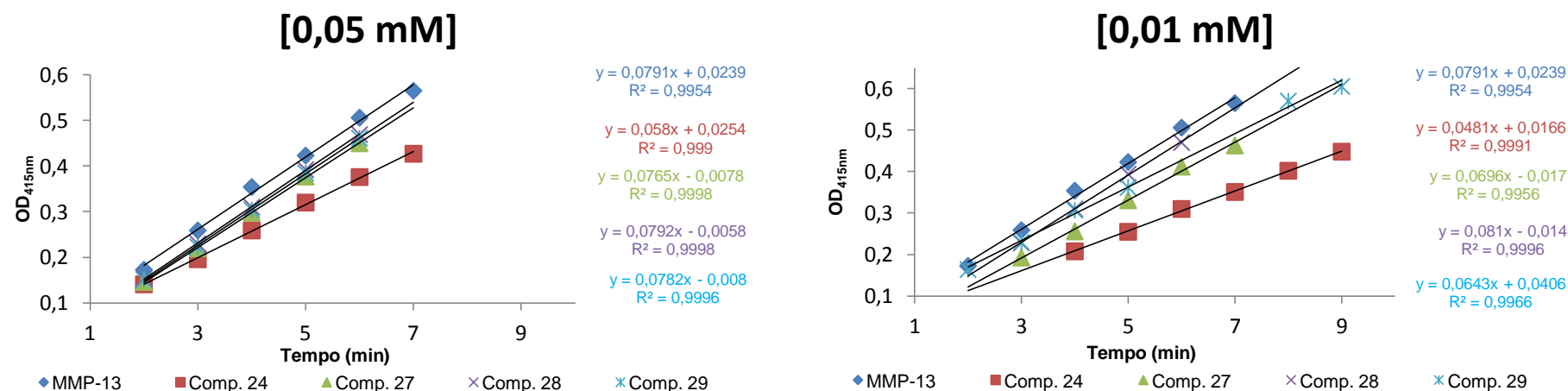


Figura 5.130: Gráficos das velocidades iniciais da actividade enzimática da MMP-13 na presença dos compostos **24**, **27**, **28** e **29** nas concentrações 0,05 mM (à esquerda) e 0,01 mM (à direita).

Tabela 5.1: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 5.

[Composto 5]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	77,90%	78,82%	78,82%	82,00%
MMP-2	93,48%	89,13%	72,77%	106,93%
MMP-8	89,29%	93,75%	72,54%	73,58%
MMP-9	59,18%	61,22%	54,32%	45,68%
MMP-13	109,38%	117,19%	59,90%	50,25%

Tabela 5.2: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 11.

[Composto 11]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	77,68%	81,32%	70,16%	84,51%
MMP-2	86,96%	100,00%	91,58%	74,75%
MMP-8	90,18%	95,54%	76,68%	103,11%
MMP-9	59,18%	75,51%	51,85%	45,68%
MMP-13	104,69%	115,63%	77,39%	46,73%

Tabela 5.3: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 15.

[Composto 15]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	79,95%	70,16%	89,98%	99,32%
MMP-2	136,96%	130,43%	96,53%	106,93%
MMP-8	113,39%	133,04%	47,67%	107,77%
MMP-9	118,37%	138,78%	104,94%	79,01%
MMP-13	149,22%	131,25%	68,54%	59,90%

Tabela 5.4: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 16.

[Composto 16]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	93,62%	102,28%	101,59%	97,95%
MMP-2	84,78%	97,83%	130,69%	116,83%
MMP-8	126,92%	73,08%	119,08%	97,69%
MMP-9	59,18%	61,22%	215,91%	186,36%
MMP-13	113,28%	79,69%	65,61%	69,03%

Tabela 5.5: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 21.

[Composto 21]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	72,67%	87,02%	80,18%	97,72%
MMP-2	91,30%	108,70%	98,02%	84,65%
MMP-8	102,68%	112,50%	92,23%	79,27%
MMP-9	30,61%	81,63%	44,44%	48,15%
MMP-13	96,88%	111,72%	81,41%	82,81%

Tabela 5.6: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 24.

[Composto 24]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	112,98%	104,56%	90,43%	105,47%
MMP-2	95,65%	89,13%	122,28%	120,30%
MMP-8	71,54%	73,08%	102,89%	101,73%
MMP-9	61,22%	61,22%	97,73%	97,73%
MMP-13	75,78%	77,34%	73,32%	60,81%

Tabela 5.7: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 27.

[Composto 27]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	106,61%	101,82%	95,90%	109,11%
MMP-2	76,09%	102,17%	108,91%	108,42%
MMP-8	71,54%	87,69%	105,78%	94,80%
MMP-9	53,06%	53,06%	104,55%	104,55%
MMP-13	93,75%	71,88%	96,71%	87,99%

Tabela 5.8: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 28.

[Composto 28]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	106,61%	105,69%	106,83%	114,12%
MMP-2	93,48%	91,30%	100,99%	96,53%
MMP-8	70,00%	60,77%	96,53%	98,84%
MMP-9	57,14%	61,22%	97,73%	97,73%
MMP-13	85,16%	71,09%	100,13%	102,40%

Tabela 5.9: Percentagens de actividade remanescente das várias MMPs, na presença do composto 29.

[Composto 29]	1 mM	0,1 mM	0,05 mM	0,01 mM
MMP-1	108,66%	107,29%	82,23%	101,82%
MMP-2	95,65%	113,04%	111,39%	106,44%
MMP-8	76,92%	46,15%	109,83%	93,64%
MMP-9	81,63%	77,55%	106,82%	104,55%
MMP-13	90,63%	260,94%	98,86%	81,29%